

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



ESTUDO MOLECULAR DE QUITINASES
DE *Crinipellis pernicios*a (Stahel) Singer

MAÍZA ALVES LOPES

ILHEUS-BAHIA-BRASIL
Agosto de 2005

MAÍZA ALVES LOPES

**ESTUDO MOLECULAR DE QUITINASES DE *Crinipellis pernicioso* (Stahel)
Singer**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**ILHEUS-BAHIA-BRASIL
Agosto de 20**

MAÍZA ALVES LOPES

**ESTUDO MOLECULAR DE QUITINASES DE *Crinipellis pernicioso* (Stahel)
Singer**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 09 de agosto de 2005

Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto
(UEFS)

Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa
(UESC)

Dr^a. Fabienne Micheli
(UESC - Orientadora)

A memória do meu pai José Carlos, a minha mãe Lucy,
Aos meus irmãos Maxwell, Márcia, Marcelo, Maria Marta,
Mércia e Marco Aurélio, Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo.

À minha Orientadora Dr^a Fabienne Micheli, pela orientação, confiança e apoio na realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pelo apoio.

Ao Co-orientador Dr. Abelmon Gesteira e ao Conselheiro Dr. Júlio Cascardo, pela colaboração.

Ao Dr. Aristóteles Góes Neto pelo apoio e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Estadual de Feira de Santa (UEFS), pelo apoio.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa de estudo.

À Dr^a Eneida Cerqueira, pela atenção, carinho, incentivo, amizade, paciência... dos últimos oito anos, pela inestimável contribuição ao meu crescimento pessoal e profissional e pela colaboração nas correções da redação desta dissertação.

Ao Prof. Carlos Priminho pelo incentivo, amizade e importante contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a Acássia Pires, pela parceria e troca de idéias.

À amiga Joci Neuby pela colaboração, apoio, companheirismo e acima de tudo pela amizade.

Aos colegas de Mestrado Geruza, Jeiza (1^a turma), Cristiano, Bruno e Fabrício (3^a turma) pelo convívio.

Aos colegas de turma em especial Alayne, Claudine, Dahyana, Dorival, Ritinha, Sônia, Stênio e Van pelo convívio, amizade e pelos momentos compartilhados.

Ao companheiro Charles Leonel (bem de Ritinha) pelo convívio e pelas orações em nosso favor.

Aos estudantes de Iniciação Científica Dayane, Gílvia, Thaís, Ondina e Braz Hora Jr. (UEFS) pela colaboração.

Ao amigo José Roberto pelo incentivo e companheirismo dos últimos anos.

Aos colegas da secretaria do colegiado da Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular Geysa, Fernanda e Andréa Argolo, pela presteza e colaboração quando necessário.

Aos colegas do Laboratório de Genética e Biologia Molecular Pelé e Robson, pelo apoio técnico e pelo convívio.

A minha família pela compreensão, apoio, incentivo e amor da vida inteira.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para o êxito deste trabalho.

ÍNDICE

EXTRATO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. <i>Crinipellis pernicioso</i> , O AGENTE ETIOLÓGICO DA VASSOURA-DE-BRUXA.....	3
2.2. A DOENÇA VASSOURA-DE-BRUXA.....	5
2.3. FORMAS DE CONTROLE DA VASSOURA-DE-BRUXA	9
2.4. AS QUITINASES E A DIGESTÃO DA QUITINA.....	10
2.5. A FUNÇÃO DAS QUITINASES.....	12
2.6. REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO E DA ATIVIDADE DAS QUITINASES	14
2.7. ASPECTOS BIOTECNOLÓGICOS DAS QUITINASES E SUAS APLICAÇÕES PARA O CONTROLE DE PRAGAS	16
3. METODOLOGIA.....	19
3.1. ANÁLISE DE SEQÜÊNCIAS	19
3.2. CULTIVO DE <i>Crinipellis pernicioso</i>	19
3.2.1. CULTIVO DE <i>Crinipellis pernicioso</i> EM MEIO LÍQUIDO	19
3.2.2. CULTIVO DE <i>Crinipellis pernicioso</i> EM SISTEMA ARTIFICIAL (BOLACHAS).....	20
3.3. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	22
3.4. EXTRAÇÃO DE RNA.....	22

3.5. TRANSFERÊNCIA DE SOUTHERN DO GENE <i>CpQUIT2</i>	23
3.6. RT-PCR (<i>REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION</i>)	25
4. RESULTADOS	27
4.1. ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DE QUITINASES DE <i>Crinipellis pernicioso</i>	27
4.2. DETECÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS GÊNICAS DE QUITINASE DE <i>Crinipellis pernicioso</i>	30
4.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>CPQUIT2</i> EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO DE <i>Crinipellis pernicioso</i>	33
5 . DISCUSSÃO	35
5.1. O SISTEMA QUITINOLÍTICO DE <i>Crinipellis pernicioso</i> É CONSTITUÍDO POR QUATRO DIFERENTES CLASSES DE QUITINASE	35
5.2. <i>Crinipellis pernicioso</i> POSSUI UMA ÚNICA CÓPIA DO GENE <i>CPQUIT2</i>	37
5.3. A EXPRESSÃO DO GENE <i>CPQUIT2</i> DE <i>Crinipellis pernicioso</i> PODE SER DISPARADA POR REDUÇÃO DE CARBONO E NITROGÊNIO	37
6. CONCLUSÕES	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

ESTUDO MOLECULAR DE QUITINASES DE *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer

Autor: MAÍZA ALVES LOPES

Orientador: Dr^a. FABIENNE MICHELI

EXTRATO

Quitina, um homopolímero de β 1-4 N-acetilglicosamina, é o principal constituinte da parede celular da maioria dos fungos, do exoesqueleto de artrópodes e da cutícula de nemátodos. Muitos destes organismos são causadores de doenças graves em plantas cultivadas, fazendo do metabolismo de quitina um alvo potencial para o controle seletivo destas pragas. Quitinases são enzimas que atuam na degradação de quitina e pertencem a duas famílias de glicosil hidrolases, famílias 18 e 19, distribuídas em cinco classes. Genes codificando para estas enzimas têm sido isolados e clonados principalmente de plantas, bactérias e fungos. Dependendo do organismo, tais enzimas têm diferentes funções. As quitinases bacterianas desempenham função nutricional liberando carbono e nitrogênio para as células a partir da hidrólise de quitina. Em plantas, atuam principalmente na defesa contra ataques de patógenos. A atividade quitinolítica também é encontrada em vírus, artrópodes, nemátodos e outros animais, mesmo naqueles que não possuem quitina na sua composição. Em fungos, as quitinases estão envolvidas em uma variedade de funções tais como digestão da parede celular, germinação e diferenciação de esporos, crescimento e autólise da hifa, assimilação de quitina e micoparasitismo.

Com o objetivo de caracterizar em nível molecular quitinases de *C. perniciosa*, seqüências de clones genômicos de quitinases disponíveis no banco de dados do fungo foram analisadas utilizando programas computacionais acessíveis em sites gratuitos. A partir destas análises 17 *contigs* foram montados e quatro diferentes classes de enzimas envolvidas na degradação de quitina, incluindo uma quitinase da família 19 das glicosil hidrolases até aqui nunca descrita para fungos, foram identificadas. A análise dos *contigs* permitiu o desenho de *primers* específicos que

foram utilizados para a amplificação de dois fragmentos gênicos denominados *CpQUIT1* e *CpQUIT2*. Em *CpQUIT1* foram identificados dois possíveis sítios de glicosilação e em *CpQUIT2* foram encontradas regiões conservadas de quitinases classe V e um sítio ativo comum entre as quitinases da família 18 das glicosil hidrolases. *CpQUIT2* foi utilizado como sonda na determinação do número de cópias por transferência de *Southern* que revelou a existência de apenas uma cópia deste gene. A expressão de *CpQUIT2* foi analisada por RT-PCR, partindo de RNA total extraído a partir das diferentes fases de desenvolvimento do fungo cultivado em sistema artificial (bolachas). O RT-PCR foi normalizado a partir da amplificação do gene de actina, que é constitutivamente expresso. A análise da expressão gênica de *CpQUIT2* por RT-PCR aponta para uma maior expressão durante a fase em que provavelmente ocorreu a redução dos nutrientes no meio de cultura e nas fases finais do desenvolvimento, onde o processo de autólise está claramente ocorrendo.

Palavras chave: *Crinipellis pernicioso*; quitinases; metabolismo de quitina; autólise.

MOLECULAR STUDY OF CHITINASES FROM *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer

Author: MAÍZA ALVES LOPES

Adviser: Dr^a. FABIENNE MICHELI

ABSTRACT

Chitin is an homopolymer of β 1-4 N-acetylglucosamine and it is the main component of the cell wall of various species of fungi, of the arthropod exoskeleton, and of the nematodes cuticle. Most of these organisms are responsible for drastic diseases in crop plants, and chitin become a good metabolic target for pest control. Chitinases are chitin-degrading enzymes which belong to five classes of two glycosyl hydrolases families, namely 18 and 19. Genes encoding chitinases have been isolated and cloned from plants, bacteria and fungi. Depending of the organism, they have different functions: bacterial chitinases have a nutritional role by releasing carbon and nitrogen to the cell; in plants, these enzymes play a role mainly in defense against pathogens. The chitinase activity was also found in virus, arthropods, nematodes and animals, even in those that do not have any chitin in their composition. In fungi, the chitinases are involved in various functions like cell wall digestion, spore germination and differentiation, growth and hyphen lyses, chitin assimilation and mycoparasitism.

Aiming to characterize chitinases from *Crinipellis pernicioso*, genomic clones available in the fungus genome databank were analyzed using bioinformatic tools. Seventeen contigs were obtained and four different classes of enzymes involved in chitin degradation were identified, including a chitinase from the family 19 which was detected in fungi for the first time. Primers, designed according to the contig analysis, were used for amplification of two genomic fragments, namely, *CpQUIT1* and *CpQUIT2*. *CpQUIT1* presents two putative glycosylation sites, and *CpQUIT2* contains conserved regions characteristic of the class V chitinase as well as a conserved active site specific of the family 18. Southern blot experiment showed that *CpQUIT2*

is present in the *C. pernicioso* genome in only one copy. The expression of the *CpQUIT2* gene was analyzed by RT-PCR using total RNA extracted from different developmental stages of *C. pernicioso* cultivated in artificial system (*bolachas*). RT-PCR was normalized using a constitutive actin gene. Expression analysis showed that *CpQUIT2* was more expressed during the stage with a reduction of nutrients in the culture medium, as well as in the final stages of the fungus development, where the autolyses process is clearly occurring.

Keywords: *Crinipellis pernicioso*; chitinases; chitin metabolism; autolyses.

LISTA DE FIGURAS

1. Ciclo de vida do basidiomiceto hemibiotrófico <i>Crinipellis pernicioso</i>	5
2. Sintomas da vassoura-de-bruxa no cacauero em relação com o desenvolvimento do <i>Crinipellis pernicioso</i>	8
3. Estrutura da quitina	10
4. Rota metabólica da quitina	10
5. Representação esquemática das diferenças estruturais entre classes de quitinases	11
6. Processo de cultura de <i>Crinipellis pernicioso</i> em meio artificial (bolachas).....	20
7. Fases do desenvolvimento do <i>Crinipellis pernicioso</i> cultivado em sistema artificial (bolachas)	21
8. RT-PCR semi-quantitativo: normalização pela amplificação do gene da actina....	26
9. Seqüências nucleotídica e protéica de <i>CpQUIT1</i>	29
10. Seqüências nucleotídica e protéica de <i>CpQUIT2</i>	29
11. Alinhamento de quitinases de fungos.....	31
12. Dendrograma de quitinases de fungos.....	32
13. Transferência de <i>Southern</i> do gene <i>CpQUIT2</i>	33
14. Expressão do gene <i>CpQUIT2</i> na diferentes fases do desenvolvimento do <i>Crinipellis pernicioso</i>	34
15. Visão geral da autólise	40

16. Eventos associados com a autólise induzida pela redução de nutrientes	40
---	----

LISTA DE TABELAS

1. Função de quitinases em diferentes organismos	13
2. Resultado da análise do BLAST para os 17 <i>contigs</i> de quitinase de <i>Crinipellis perniciosa</i>	28

1. INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao*) é uma espécie nativa da Amazônia, e até o início do século XX, as maiores regiões produtoras de cacau do mundo eram o litoral do Equador e o Estado da Bahia, no Brasil (LASS, 1985). Ambas as regiões, no entanto, sofreram um declínio significativo da produção devido à devastação causada pela doença vassoura-de-bruxa, fazendo com que o Brasil passasse da condição de maior exportador de cacau para a de maior importador do produto na última década (PEREIRA et al., 1996; PURDY; SCHMIDT, 1996). Atualmente, os maiores produtores mundiais de cacau são Costa do Marfim e Gana. Entretanto, o foco da produção global tem se deslocado para países do Extremo Oriente, como Malásia e Papua Nova Guiné, onde tem ocorrido crescimento da produção, além de plantações experimentais estarem sendo estabelecidas no norte da Austrália (GRIFFITH et al., 2003).

A doença vassoura-de-bruxa do cacauieiro é causada pelo *Crinipellis perniciosa* (Sthael) Singer, um fungo hemibiotrófico que se transformou no maior problema fitopatológico das regiões produtoras de cacau nas Américas (PEREIRA et al. 1996). Assim como o cacauieiro, a vassoura-de-bruxa também tem sua origem na região Amazônica tendo chegado ao Sul da Bahia em 1989 (PEREIRA et al., 1989), onde encontrou condições favoráveis ao seu desenvolvimento transformando-se em uma epidemia que atingiu quase a totalidade das lavouras. A grande incidência da doença juntamente com a queda do preço do cacau no mercado internacional resultou em grandes prejuízos econômicos, levando muitos produtores a abandonar a cultura. Em consequência deste êxodo ocorreram sérios problemas sociais, econômicos e ecológicos para a região que tinha na cacauicultura a principal

atividade econômica, gerando empregos diretos e indiretos para milhares de famílias, além de permitir a conservação da Mata Atlântica, já extremamente degradada.

O manejo recomendado para reduzir os efeitos deletérios da vassoura-de-bruxa inclui o controle fitossanitário, a aplicação de fungicidas químicos e o uso de plantas resistentes (DE MARCO et al., 2000). Entretanto os genótipos resistentes utilizados nas lavouras apresentam níveis médios de resistência e carecem de muitos tratos culturais. Diante da importância econômica do fungo e do pouco conhecimento da sua genética, foi implantado um consórcio para o seqüenciamento do genoma do *C. pernicioso* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>). A partir do seqüenciamento do genoma do fungo, poderá ser gerado importante conhecimento sobre o funcionamento dos seus genes, o que contribuirá para um melhor entendimento de sua biologia possibilitando o estabelecimento de novas medidas para impedir a sua propagação.

Já foram identificados entre as seqüências gênicas de *C. pernicioso* genes envolvidos em rotas metabólicas importantes como a da quitina, principal componente da parede celular do fitopatógeno. O conhecimento relacionado a aspectos funcionais destes genes poderá levar ao desenvolvimento de formas mais eficientes de combate à doença, considerando que a interferência no metabolismo da quitina é uma estratégia utilizada para o controle de inúmeros fungos fitopatogênicos. Os genes codificando enzimas envolvidas na degradação da parede celular do fungo, quando bem caracterizados quanto a sua expressão e regulação e quanto à forma de ação dos produtos gênicos, poderão ser alvos de interferência, promovendo a instabilidade das paredes celulares do fungo, possibilitando a autodestruição das hifas e, conseqüentemente, a inibição do crescimento do patógeno. Objetivou-se neste trabalho a caracterização molecular de genes de quitinase, recentemente identificado pelo Projeto Genoma do *Crinipellis pernicioso*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 . *Crinipellis pernicioso*, o agente etiológico da vassoura-de-bruxa.

O agente causador da vassoura-de-bruxa do cacau é um patógeno bastante destrutivo, representando um dos maiores limitantes à produção de cacau na América do Sul e Caribe (THOROLD, 1975). Primeiramente chamado de *Marasmius perniciosus*, foi renomeado *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, quando Singer revisou o Gênero *Marasmius* (GRIFFITH et al., 2003; PURDY; SCHMIDT, 1996). *C. pernicioso* está na Ordem Agaricales, Família Tricholomataceae, e é endêmico da Bacia Amazônica, sendo o único patógeno do cacau que se desenvolve concomitantemente com o cacau (PURDY; SCHMIDT, 1996).

Além do cacau o *C. pernicioso* também é capaz de infectar outras espécies e tem sido encontrado em associação com várias plantas hospedeiras das famílias Malvaceae, Solanaceae, Bignoniaceae, Bixaceae e Malpighiaceae, que não são relacionadas ao cacau. Sintomas similares aos encontrados no cacau estão presentes em uma variedade de hospedeiros arbóreos e herbáceos pertencentes a Solanaceae e Malpighiaceae (*Heterpterys acutifolia*) por todo Brasil. No caso dos hospedeiros solanáceos, os sintomas aparecem em uma grande variedade de plantas incluindo tomate, batata, pimenta e berinjela, embora a morfologia dos órgãos infectados seja dependente do padrão de crescimento do hospedeiro (GRIFFITH et al., 2003).

Vários biotipos de *C. pernicioso* foram descritos por Griffith e Hedger (1994). Estes autores subdividiram esta espécie em três discretos biotipos: o biotipo-C que infecta espécies de *Theobroma* e *Herrania* (Malvaceae); o biotipo S, que afeta vários membros da família Solanaceae; e, o biotipo-L, que pode ser encontrado em cipós.

Os biotipos C e S causam os sintomas característicos da vassoura-de-bruxa em seus respectivos hospedeiros, mas não existem evidências de que o biotipo-L esteja ligado a qualquer um dos sintomas da doença.

Os basidiósporos são as únicas estruturas em condições naturais capazes de infectar o cacauzeiro. Estes são produzidos em lamelas na parte inferior do píleo do basidiocarpo, onde os dois núcleos nas células da hifa dicariótica da camada do himênio migram dentro do basídio enquanto ocorre a fusão nuclear. Subseqüentemente, ocorre a meiose e, após a segunda divisão meiótica, os quatro núcleos migram através dos quatro esterigmas onde os basidiósporos hialinos se desenvolvem em cada um dos quatro esterigmas (revisado por PURDY; SCHMIDT, 1996; SILVA; MATSUOKA, 1999; SREENIVASAN; DABYDEEN, 1989).

Os basidiósporos são liberados em condições ambientais em que a umidade está próxima da saturação (>99% de umidade relativa) e a temperatura variando entre 20 e 30° C (ROCHA; WHELLER, 1985). Por serem muito sensíveis a radiação UV-B e facilmente dessecados, perdendo a sua capacidade de germinação, é muito improvável que estes possam se dispersar a uma distância superior a 60 km (FRIAS et al., 1991; ANDEBRHAN et al., 1993). Eles são tipicamente liberados a noite e dispersados pelo vento e pela chuva. Os basidiósporos germinam na superfície da planta e produzem tubos germinativos que penetram no hospedeiro, atraídos pelos estômatos ou pelas bases dos tricomas injuriados (revisado por PURDY; SCHMIDT, 1996; SILVA; MATSUOKA, 1999; SREENIVASAN; DABYDEEN, 1989) (Figura 1).

Após a penetração, o micélio biotrófico ramifica entre as células do hospedeiro. Apenas o micélio biotrófico está presente nos tecidos infectados verdes, e a hifa cresce sem grampos de conexão e com diâmetro entre 5 µm e 20 µm. Após três a nove semanas, começa o processo de dicarionização e o micélio entra na fase saprofítica, na qual a hifa apresenta-se mais estreita com um diâmetro entre 1-3 µm e já apresentando grampos de conexão. Durante a transição dos tecidos infectados verdes a tecidos necróticos, os micélios biotrófico e saprofítico estão presentes dentro do tecido do hospedeiro. Cerca de quatro a oito semanas após o começo das chuvas, os basidiocarpos surgem do micélio dicariótico dos tecidos necróticos, um estipe é formado e o píleo se desenvolve (Figura 1). O píleo é usualmente esbranquiçado com uma coloração rubra no centro e radialmente na superfície superior, enquanto as lamelas na superfície inferior, onde se desenvolvem os basídios, são brancas (revisado por PURDY; SCHMIDT, 1996).

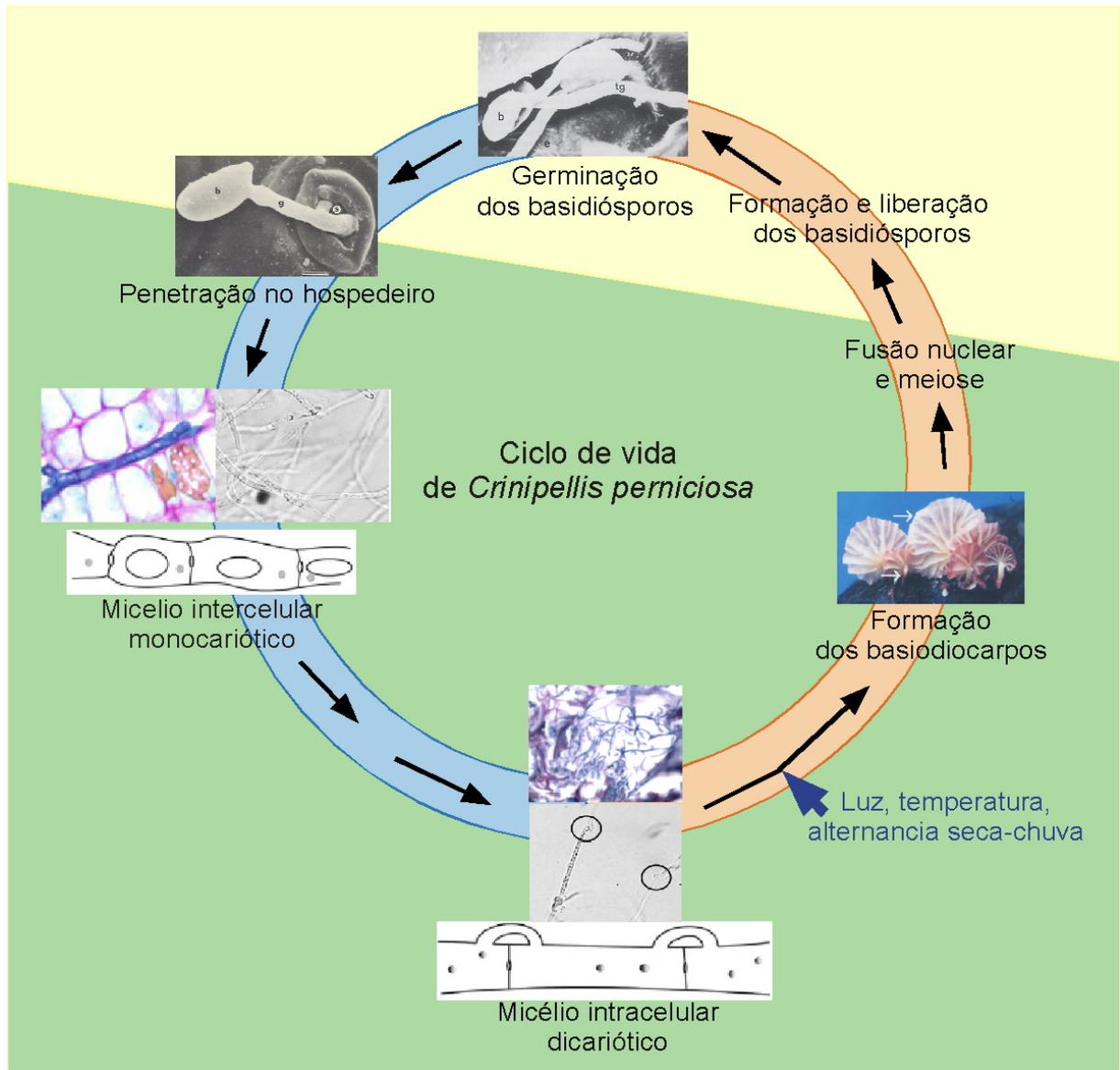


Figura 1 - Ciclo de vida do basidiomiceto hemibiotrófico *Crinipellis pernicioso*.

As partes azul e laranja do ciclo correspondem, respectivamente, às fases biotrófica e saprofítica do fungo durante a sua interação com o cacaveiro. Em verde, foi delimitada a parte do ciclo correspondendo à interação com o cacau, em amarelo, a parte do ciclo acontecendo fora do hospedeiro. De acordo com Silva et al. (2002), Scarpari et al. (2004), Ceita et al. (2005), Sreenivasan e Dabydeen (1989) e Silva e Matsuoka (1999).

2.2. A doença vassoura-de-bruxa

A vassoura-de-bruxa foi descrita pela primeira vez na Região Amazônica por Ferreira em 1785, que devido às más formações observadas a denominou de “lagartão”. Mais de cem anos depois, a doença teve sua ocorrência registrada no Suriname (1895), Guiana (1906), Colômbia (1917), Equador (1921), Trinidad (1928)

Tobago (1939), Granada (1948), São Vicente (1988), Panamá (1989) e no Estado da Bahia, no Brasil (1989) (PURDY; SCHMIDT, 1996).

Os sintomas da doença podem variar dependendo do órgão afetado. Os basidiósporos de *C. pernicioso* são capazes de infectar o tecido meristemático de *Theobroma cacao* e de várias espécies do gênero *Theobroma* e *Herrania*, todos membros da família Malvaceae (GRIFFITH et al., 2003). A infecção de tecidos meristemáticos do cacauzeiro como brotos vegetativos, almofadas florais e flores em desenvolvimento pelo *C. pernicioso* causa o intumescimento e ramificação do órgão atingido dando a aparência de uma vassoura-de-bruxa. Essas vassouras são de um verde vívido quando jovens, mas dados 1-2 meses, dão uma coloração marrom ao dossel das árvores severamente infectadas (GRIFFITH et al., 2003). Nos frutos os sintomas variam com a idade, o tamanho e o modo de infecção (SILVA et al., 2002). Segundo Stahel (1915), existem dois tipos de infecção dos frutos: indireta, por micélio, através do pedicelo de flores infectadas, e direta, por basidiósporos, através da epiderme. Essa infecção direta afeta os frutos jovens e desenvolvidos (Figura 2).

Esses sintomas característicos da doença são resultantes da hipertrofia e hiperplasia dos tecidos infectados e da perda da dominância apical, levando a morte e subsequente exploração saprofítica pelo patógeno (WHEELER, 1985). Embora os sintomas sejam sugestivos de um desequilíbrio na regulação do crescimento, como por exemplo, a degradação de auxinas ou liberação de citocininas pelo fungo (GRIFFITH et al., 2003), os mecanismos que os desencadeiam permanecem desconhecidos (ORCHARD et al., 1994). Os fatores que levam a morte o tecido infectado também são pouco conhecidos. Ceita et al. (2005) sugerem que a degradação do tecido causada por *C. pernicioso* está ligada a fragmentação do DNA e a morte celular programada (PCD – *Programmed Cell Death*). Estes processos estariam relacionados ao acúmulo de cristais de oxalato de cálcio em altos níveis nos tecidos de plantas infectadas que, durante a progressão da doença, dão lugar a uma alta concentração de H₂O₂ no córtex do tecido infectado disparando o processo de PCD. A morte do órgão infectado pode ser causada por uma cascata de eventos disparada por alterações bioquímicas, como o aumento do conteúdo de açúcares, mudanças na composição de ácidos graxos, redução de aminoácidos e pigmentos observados durante o desenvolvimento da doença. O aumento nos níveis de etileno, no início do desenvolvimento dos sintomas, e o seu declínio com a morte

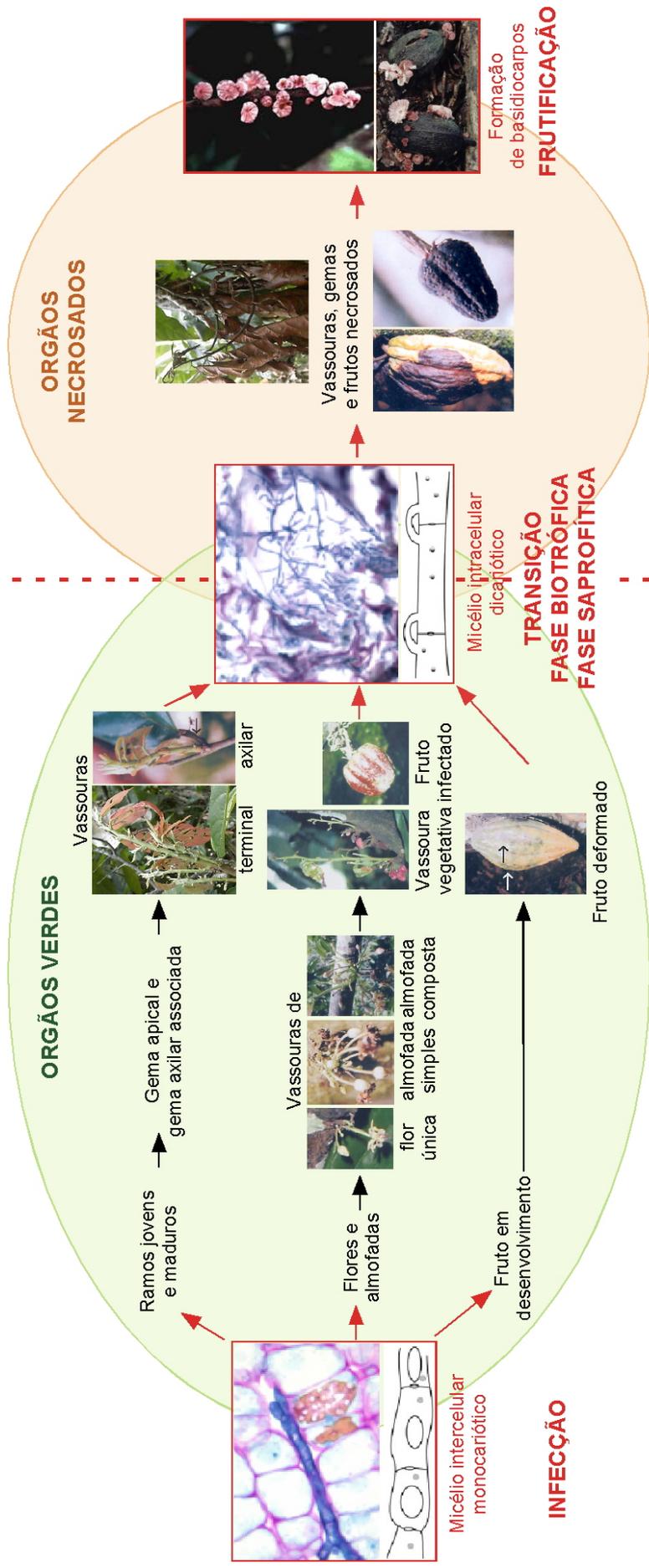


Figura 2 - Sintomas da vassoura-de-bruxa no cacaueiro em relação com o desenvolvimento do *Crinipellis perniciosa*. Em verde e marrom são representadas as fases biotrófica e saprofítica do fungo, respectivamente. Em vermelho, são indicados os dados referentes ao fungo; em preto, estes referentes à planta. De acordo com Silva et al. (2002), Scarpari et al. (2004) e Ceita et al. (2005).

do tecido infectado, sugerem que o etileno tenha um papel importante na coordenação de mudanças bioquímicas em resposta ao estresse (SCARPARI et al., 2004). A presença de proteínas PRs (relacionadas à patogênese) detectadas na vassoura verde é sugestiva de uma tentativa de aumento da resposta de defesa do hospedeiro (GRIFFITH et al., 2003).

2.3. Formas de controle da vassoura-de-bruxa

Apesar do grande número de pesquisas e um século de registro da doença (GRIFFITH et al., 2003; PURDY; SCHMIDT, 1996) nenhuma estratégia de controle efetivo da doença foi desenvolvida. O uso de fungicidas tem se mostrado ineficiente e para árvores é impraticável em áreas de alta incidência de chuvas, embora a proteção de frutos em desenvolvimento pela aplicação de fungicidas seja rotineiramente praticada (SOBERANIS et al., 1999). A poda sanitária tem sido empregada como uma alternativa para o controle da vassoura-de-bruxa, entretanto tem se mostrado parcialmente efetiva, pois a remoção de fontes de inóculo deve ser feita por todos os fazendeiros de uma dada área para ser efetivo, além disso, é dispendiosa em termos de mão-de-obra (GRIFFITH et al., 2003).

Em longo prazo, a solução para o problema da vassoura-de-bruxa seria o desenvolvimento de variedades de cacauzeiros com alta produtividade e resistência ao patógeno. Algumas variedades resistentes têm sido identificadas por programas de triagem de variedades “selvagens” da Amazônia, mas a geração desses programas é lenta, e é difícil combinar em uma mesma variedade resistência e características como melhor sabor da semente e alta produtividade. Nos últimos, vários clones com elevada tolerância têm sido desenvolvidos. Entretanto, ainda é preciso observar como efetivamente estes clones irão resistir à doença no campo (GRIFFITH et al., 2003).

Uma nova estratégia no combate à vassoura-de-bruxa é o controle biológico (KRAUSS; SOBERANIS, 2001). Por exemplo, a linhagem 1051 de *Trichoderma harzianum* mostrou a capacidade de afetar drasticamente o crescimento do *C. perniciosus* em condições de campo (DE MARCO et al., 2000). Com o avanço das técnicas de biologia molecular, importantes alternativas podem ser obtidas para o controle da vassoura-de-bruxa a partir do estudo molecular da interação *Crinipellis*

perniciosa-Theobroma cacao e da biologia do fungo. Neste sentido, o seqüenciamento do genoma do *C. perniciosa* contribui significativamente para a ampliação dos conhecimentos sobre a genética deste patógeno, identificando genes envolvidos em processos biológicos importantes como, por exemplo, o gene de quitinase que atua nas modificações da parede celular do fungo.

2.4. As quitinases e a digestão da quitina

As quitinases são enzimas que clivam as ligações glicosídicas β -1,4 presentes nos polímeros de N-acetilglicosamina (GlcNac), principalmente a quitina (Figura 3), e que estão presentes nos mais variados organismos, mesmo naqueles que não são constituídos por quitina. Estas enzimas desempenham um importante papel fisiológico e ecológico nos ecossistemas, reciclando a quitina, fornecendo carbono e nitrogênio (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998). As quitinases podem ser divididas em duas categorias: endoquitinases, que clivam randomicamente sítios internos gerando multímeros de GlcNac solúveis e de baixa massa molecular (SAHAI; MANOCHA, 1993), e exoquitinases, que mostram ter atividade apenas para a extremidade não reduzida de quitina gerando monômeros de GlcNac (Figura 4) (HARMAN et al., 1993).

As quitinases até agora seqüenciadas são classificadas, no sistema de classificação de glicosil hidrolases baseado na similaridade de suas seqüências aminoacídicas e domínios, dentro de duas famílias de glicosil hidrolases, as famílias 18 e 19 (HENRISAT, 1991; HENRISAT; BAIROCH, 1993). As quitinases da família 19 são majoritariamente originadas de plantas e são subdivididas em três classes I, II e IV. As quitinases das classes I e IV possuem um domínio rico em cisteína na porção N-terminal, que está envolvido na ligação ao substrato. Muitas quitinases da classe I apresentam um sinal de endereçamento vacuolar na sua porção carboxiterminal. As quitinases da classe IV são menores do que as quitinases da classe I devido a deleções tanto no domínio rico em cisteína quanto no domínio catalítico. As quitinases da classe II são homólogas as quitinases das classes I e IV, exceto pela ausência do domínio rico em cisteína (UEDA et al., 2003). Recentemente, quitinases da família 19, com domínio catalítico homólogo as quitinases classes I, II e IV de plantas, foram descritas em espécies

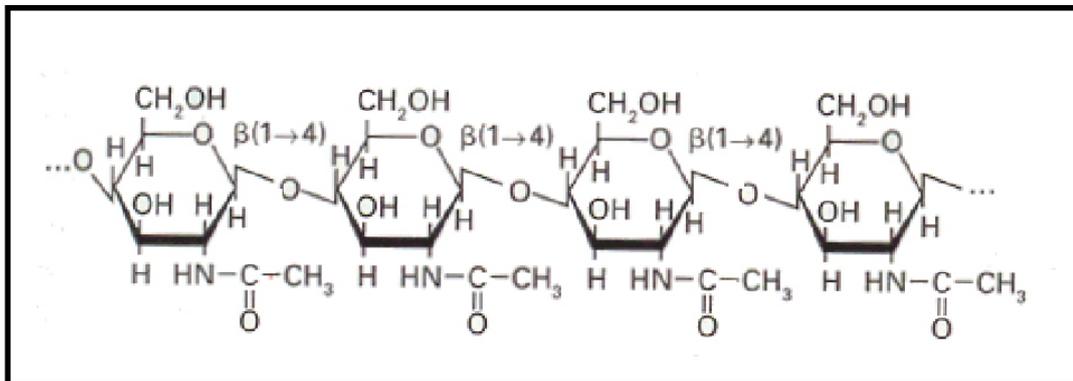


Figura 3 - Estrutura da quitina.

A quitina é um polímero de unidades de N-acetilglicosamina (GlcNAc) conjugadas por ligações glicosídicas β -1,4.

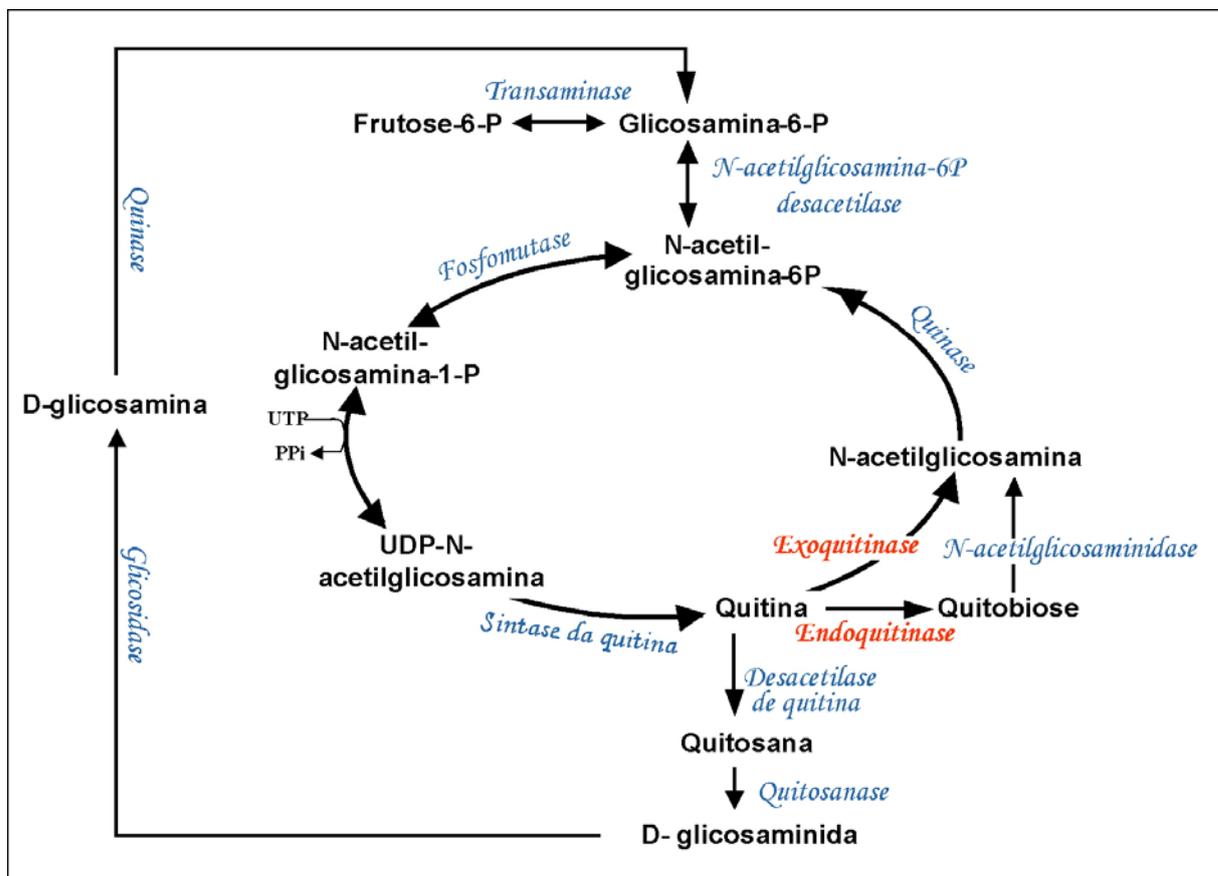


Figura 4 - Rota metabólica da quitina. De acordo com <http://www.genome.ad.jp/kegg/metabolism.html>

de *Streptomyces* (OHNO et al. 1996; WATANABE et al., 1999) e em espécies de *Aeromonas* (UEDA et al., 2003) (Figura 5).

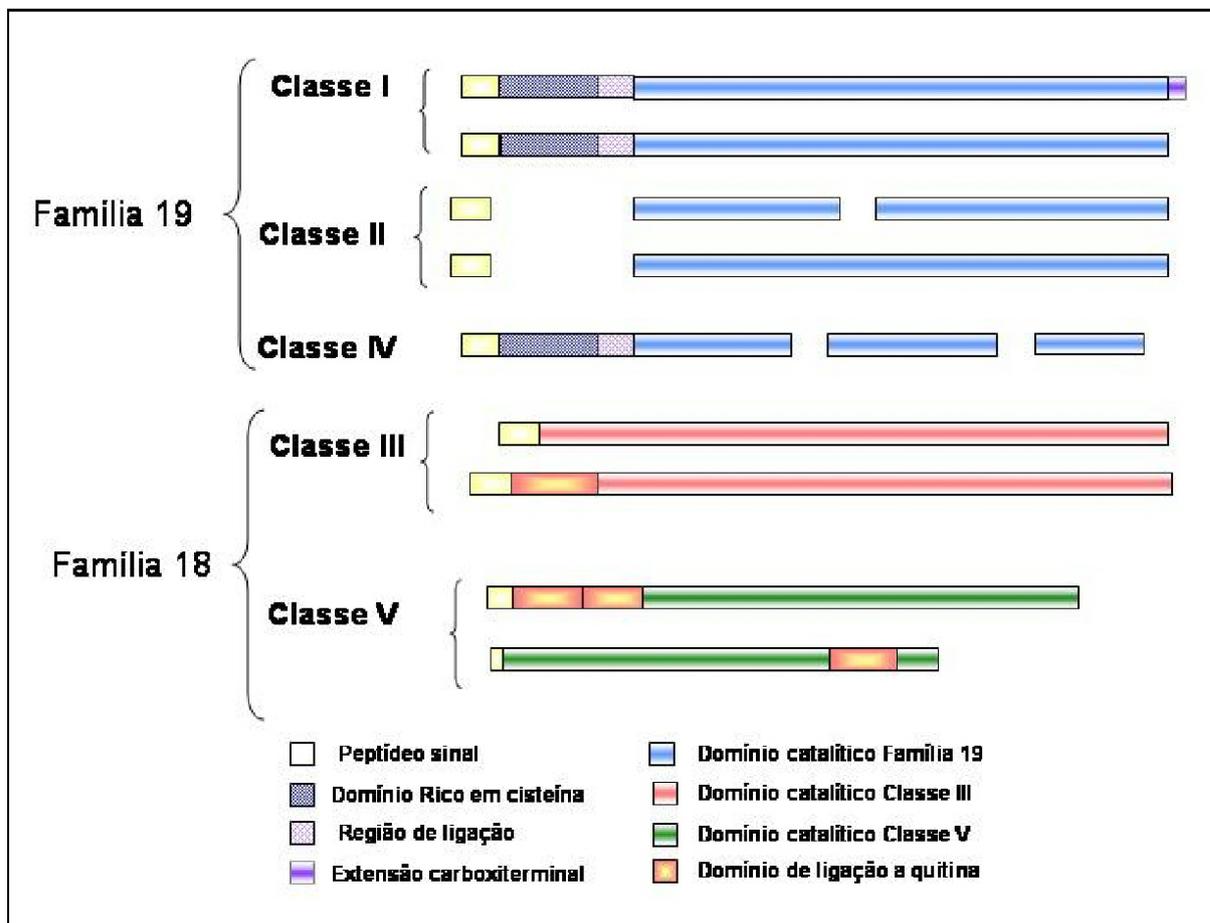


Figura 5 - Representação esquemática das diferenças estruturais entre classes de quitinases.

As quitinases das classes I, II e IV (encontradas em plantas e bactérias) compartilham alta similaridade exceto por algumas deleções encontradas no domínio catalítico das quitinases das classes II e IV e pela ausência do domínio rico em cisteína nas quitinases de classe II. As quitinases da família 18 podem ter múltiplos domínios e são amplamente distribuídas na natureza sendo encontradas em plantas, bactérias e animais. Segundo Hamel et al. (1997), Wang et al. (2001) e Cohen-Kupiec e Chet (1998).

As quitinases da família 18 são muito diversificadas e distribuem-se em duas classes (classes III e V) que compartilham pouca similaridade entre si. As quitinases de classe III são encontradas principalmente em plantas e fungos, as quitinases de classe V são encontradas principalmente em bactérias; entretanto, proteínas da classe V com atividade de endoquitinase semelhante a quitinases de bactérias são

encontradas em fungos e em tabaco (COHEN-KUPIEC; CHET 1998; HAMEL et al., 1997). Um peptídeo sinal requerido para secreção da proteína e um domínio de ligação a quitina estão usualmente presentes. Muitas quitinases possuem múltiplos domínios, alguns dos quais ainda não foram caracterizados (WANG et al., 2001).

As quitinases das famílias 18 e 19 não compartilham similaridade entre as suas seqüências de aminoácidos, apresentando diferenças em sua estrutura tridimensional (WATANABE et al., 1999). Além da diferença na estrutura tridimensional, as quitinases das duas famílias mostram diferenças importantes em suas propriedades bioquímicas. Por exemplo, as quitinases da família 18 hidrolisam as ligações glicosídicas com a retenção da configuração anomérica do produto (KASPRZEWSKA, 2003), enquanto a reação de hidrólise realizada por quitinases da família 19, apresenta um mecanismo de catálise ácida com a inversão da configuração anomérica (OHNO et al., 1996). As quitinases da família 18 são inibidas por alosamidina enquanto, as da família 19 são inibidas por amidinas e amidrazonas, além de diferirem em relação à especificidade do substrato, indicando uma provável evolução a partir de diferentes genes codificando “protoquitinases” (KASPRZEWSKA, 2003).

2.5. A função das quitinases

Além de insetos, crustáceos, nematóides, fungos e outros organismos onde a quitina é um componente estrutural, vírus, bactérias, peixes, anfíbios, mamíferos e angiospermas e gimnospermas, que não possuem quitina em sua estrutura também apresentam enzimas com atividade quitinolítica (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998). A função desempenhada por estas enzimas varia dependendo do organismo (Tabela 1). Em organismos onde a quitina faz parte da composição da parede celular ou de determinadas estruturas, as quitinases têm principal função nas modificações estruturais. Quitinases bacterianas têm função nutricional atuando na degradação de quitina que é utilizada como fonte de carbono e nitrogênio para a célula (WIWAT et al., 2002). Em animais estas enzimas atuam na defesa contra ataques de patógenos que possuem quitina na sua composição (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998). Em plantas, a maioria das quitinases é induzida por fatores de estresse, principalmente por infecções, e algumas isoformas mostram atividades antifúngicas em testes *in*

vitro. Por isso, o papel das quitinases é usualmente considerado como um mecanismo de defesa, ativo ou passivo, contra patógenos (HAMEL; BELLEMARE, 1995; REGALADO et al., 2000; KRISHNAVENI et al., 1999).

Tabela 1 - Função de quitinases em diferentes organismos.

Classe	Função	Organismo	Referência
Classe I	Associação com micorrizas	<i>Picea abis</i>	Salzer et al. (1997)
Classe I	Resposta a patogênese	<i>Leucaena</i>	Kaomek et al. (2003)
		<i>Leucocephala</i>	
Classe II	Processo de crescimento	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Zhong et al. (2002)
Classe II	Resposta a patogênese	<i>Secale cereale</i>	Taira et al. (2002)
Classe III	Estocagem de Proteínas	<i>Musa spp.</i>	Peumans et al. (2002)
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kuranda; Robbins (1991)
Classe IV	Morte celular programada	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Passarinho et al. (2001)
Classe V	Reciclagem de quitina durante a autólise da hifa	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Jaques et al. (2003)

Entretanto os resultados de investigações recentes indicam que quitinases podem não somente estar envolvidas nos processos relacionados à defesa ou resposta a estresse, mas também nos processos de crescimento e desenvolvimento (KASPRZEWSKA, 2003). Tem sido também sugerido que estas enzimas participam do processo de morte celular programada (PCD) e que podem estar também envolvidas em outras funções, como estocagem de proteínas, resistência a resfriamento e congelamento, inibição da atividade de outras enzimas como protease aspártica e α -amilase e atuação na simbiose com fungos micorrizos (KASPRZEWSKA, 2003). As quitinases produzidas por fungos mostram-se envolvidas em uma variedade de funções. A inativação de um gene de quitinase (*CTS1*) de *Saccharomyces cerevisiae* levou a inibição da separação das células durante a divisão celular (KURANDA; ROBBINS, 1991) enquanto a inativação do gene *ChiA* de *Aspergillus nidulans* levou a um decréscimo na taxa de crescimento e na freqüência da germinação de esporos (TAKAIA et al., 1998a). Estes resultados

indicam que estas enzimas tenham importante papel nos processos de digestão da parede celular, germinação de esporos, crescimento e autólise da hifa. As quitinases estão envolvidas ainda com os processos de diferenciação em esporos e nutrição (GOODAY, 1990, 1997; FLACH et al., 1992).

Os genes codificando quitinases de *T. harzianum* têm sido clonados e suas expressões durante a infecção do hospedeiro monitorada (CHET et al., 1997; ZELLINGER et al., 1999). Estas enzimas têm sido alvos de intensa investigação devido ao importante papel por elas desempenhado durante a atividade de micoparasitismo desenvolvida por fungos saprófitos sobre fitopatógenos como o *C. perniciosus* (CHET et al., 1997, DE MARCO et al., 2000). Embora o mecanismo de micoparasitismo não seja completamente entendido, sabe-se que ocorre uma ação complementar de antibiose, competição por nutrientes e enzimas capazes de degradar a parede celular tais como proteases, quitinases e β -1,3-glicanases. Uma vez que a quitina é o maior componente da parede celular da maioria dos fungos foi proposto que as quitinases desempenham um papel primário na atividade de biocontrole de *Trichoderma* (HARMAN, 2000). Experimentos realizados *in vitro* comprovaram que a hidrólise de quitina é sensivelmente aumentada pelo efeito sinérgico provocado pela combinação de duas ou mais enzimas hidrolíticas principalmente entre endoquitinases e β -1,3-glucanase (HARMAN et al., 1993; LORITO et al., 1994).

2.6. Regulação da produção e da atividade das quitinases

Em plantas saudáveis, quitinases vacuolares e apoplásticas, são sintetizadas constitutivamente. Entretanto, quitinases de plantas podem ser reguladas por uma variedade de condições de estresse bióticos e abióticos e por fitohormônios como etileno, ácido jasmônico e ácido salicílico (KASPRZEWSKA, 2003). Em microrganismos a expressão de quitinases tem sido relatada como um sistema de controle do tipo indutor-repressor, em que a quitina ou outros produtos de sua degradação atuam como indutores (FELSE; PANDA, 1999).

Muitas tentativas de explicar como ocorre a indução de genes de quitinase em diversos microrganismos têm sido feitas. St. Leger et al. (1986) encontraram que N-acetilglicosamina é o mais eficiente indutor de quitinase em *Metarhizium anisopilae* e

sugerem que a regulação do gene de quitinase pode ser afetada pela expressão de quitobiase, que é constitutivamente expressa e é muito eficiente em degradar dímeros e trímeros de N-acetilglicosamina que contribuem para liberação de indutores de quitina. Em 1969, Monreal e Reese detectaram que, em *Serratia marcescens* uma maior quantidade de quitinase é produzida na presença de quitina do que na presença de N-acetilglicosamina, e sugerindo que os prováveis indutores sejam oligômeros solúveis derivados da quitina, mas não os monômeros (N-acetilglicosamina). *Aspergillus fumigatus* crescido em meio contendo quitina como única fonte de carbono apresentou um aumento na atividade quitinolítica extracelular. O efeito foi reprimido pela adição de GlcNac no meio indicando um mecanismo de regulação por retroalimentação negativa (ESCOTT et al., 1998). Segundo Ulhoa e Peberdy (1991), a síntese de quitinase em *T. harzianum* também é regulada pelos produtos de degradação de quitina. A alta atividade de quitinase foi encontrada somente em culturas supridas com quitina, mas não com outros polímeros como celulose e quitosanas, o que é um forte indicativo de indução por produtos de degradação de quitina. Em meios de cultura com N-acetilglicosamina não houve aumento da produção, ao contrário, houve a inibição da síntese de quitinase. A repressão da expressão do gene também foi observada na presença de glicose.

Ulhoa & Peberdy (1991) também sugerem que o sinal para indução do gene de quitinase pode resultar do contato físico entre a superfície celular e o substrato insolúvel subentendendo que os organismos que produzem quitinase podem possuir um receptor específico para quitina na superfície celular. Entretanto, nenhuma verificação experimental tem comprovado o envolvimento de sinalização celular na expressão dessa enzima. Um mecanismo similar tem sido proposto para síntese de celulase (BINDER; GHOSE, 1978).

Outra explicação para a indução de quitinase é que microorganismos quitinolíticos têm traços de enzimas constitutivas, que são continuamente liberadas em condições independentes da ativação (ULHOA; PEBERDY, 1991). Vasseur et al. (1990) isolaram um mutante de *Aphanocladium album* com um alto nível de atividade de quitinase constitutiva, o que permitiu a degradação inicial de quitina e a indução precoce da quitinase. Ulhoa e Peberdy (1991) apresentaram evidências de que *T. harzianum* produz quitinase em níveis constitutivos de enzima produzidos incubando-se o micélio com glicose, N-acetilglicosamina, glicosamina, sacarose,

manose ou xilose, ou todos esses compostos na ausência de outra fonte de carbono. Desses resultados, os autores concluíram que os prováveis indutores de quitinase em *T. harzianum* são oligossacarídeos solúveis derivados da preparação da quitina ou da ação de quitinase constitutiva.

A repressão da síntese de quitinase por glicose em quase todos os microrganismos é um indicativo de que a repressão por catabólitos pode estar envolvida na regulação de genes de quitinase microbiana. Limón et al. (1995) observaram que um gene codificando uma quitinase de 33 kDa (*CHIT33*) em *T. harzianum* foi severamente reprimido por glicose e desreprimido na presença da parede celular de fungos contendo quitina. A expressão de *CHIT33* não foi induzida por quitina ou por oligômeros de quitina. Embora tenha ocorrido uma elevada expressão de *CHIT33* a nível transcricional em condições de inanição, muito pouca atividade de quitinase pode ser observada, sugerindo uma regulação pós-transcricional do gene. Os autores sugerem que a alta atividade proteolítica relatada sob condições similares pode também ser a razão para os baixos níveis de quitinase. Porém, não há nenhum dado experimental para explicar conclusivamente qualquer regulação pós-transcricional ou degradação proteolítica. Limón et al., (1995) também observaram que o nível intercelular de quitinase foi sempre constante e em níveis basais. Isto pode indicar que quitinases podem ser requeridas para funções celulares no citoplasma.

Embora as enzimas quitinolíticas de fungos filamentosos, principalmente daqueles com potencial uso como agentes de biocontrole como, por exemplo, os do gênero *Trichoderma*, tenham sido amplamente caracterizadas nos últimos anos, os mecanismos de regulação da expressão de quitinases em basidiomicetos como o *C. perniciosus* são quase que totalmente desconhecidos.

2.7. Aspectos biotecnológicos das quitinases e suas aplicações para o controle de pragas

A quitina é um polissacarídeo estrutural que ocorre no exoesqueleto de artrópodes, na cutícula de nematóides e na parede celular dos fungos (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998) e, por isso, o metabolismo de quitina é considerado um excelente alvo para o controle seletivo de pragas (KRAMER; MUTHUKRISHNAN,

1997). As quitinases têm a capacidade de dissolver a parede celular de vários fungos, propriedade que tem sido usada para a geração de protoplastos de fungos. Uma quitinase produzida por uma linhagem de *Bacillus circulans* KA-304 se mostrou, juntamente com α -1,3 glicanases, ser indispensável para a produção de protoplastos de *Schizophyllum commune* (YANO et al., 2004). As quitinases que têm mostrado maior eficiência na geração de protoplastos de diferentes fungos são aquelas isoladas de *T. harzianum* (ANJANI KUMARI; PANDA, 1992).

Genes de quitinases isolados de diferentes espécies de insetos têm sido aplicados na transformação de plantas, que passaram a apresentar um aumento na atividade inseticida. Estas enzimas também potencializam a eficiência de toxinas microbianas com propriedades inseticidas, como a toxina produzida pelo *Bacillus thuringiensis*. Genes de quitinases de insetos estão agora disponíveis para aplicação como biopesticidas em programas de manejo integrado de pragas (KRAMER; MUTHUKRISHNAN, 1997).

Muitas plantas transgênicas contendo genes de quitinases vegetais têm sido produzidas visando aumentar a resistência a fitopatógenos. Cenoura engenheirada com uma quitinase classe I de tabaco exibiu um aumento na resistência a *Botrytis cinerea* (PUNJA et al., 1996), enquanto tabaco transgênico abrigando uma quitinase classe I de feijão exibiu aumento da resistência a *Rhizoctonia solani* (BROGLIE et al., 1991). Contudo, plantas de tabaco transformadas com uma quitinase da classe I de tabaco sob o controle do promotor 35S não exibiram aumento na resistência a *Cercospora nicotianae*, embora apresentassem aumento na atividade de quitinase (NEUHAUS et al., 1991). O aumento da resistência de plantas transgênicas a patógenos depende dos níveis de expressão e da localização do gene de quitinase na planta (KISHIMOTO et al., 2002).

Muitos microrganismos têm se apresentado como uma importante fonte de genes de quitinases e são utilizados na produção de plantas transgênicas resistentes a doenças provocadas por fitopatógenos. Um gene (*ChiC*) codificando uma quitinase da família 19 de *S. griseus* foi utilizado na transformação de plantas de arroz. A maioria dos transformantes (90%) teve sua resistência aumentada a *Magnaporthe grisea* (ITOH et al., 2003). Entretanto, as enzimas quitinolíticas de *T. harzianum* parecem ser mais efetivas contra uma grande gama de fitopatógenos do que as quitinases de plantas e bactérias. Um gene codificando uma endoquitinase de 42 kDa de *T. harzianum*, com uma elevada atividade antifúngica, foi transferido

para tabaco e batata. Altos níveis de expressão do gene de quitinase do fungo foram obtidos em diferentes tecidos da planta. Diferenças substanciais na atividade de endoquitinase foram detectadas nos transformantes. Linhagens transgênicas se apresentaram altamente tolerantes ou completamente resistentes aos patógenos *A. alternata*, *A. solani*, *Botrytis cinerea* e *R. solani*. O alto nível e o amplo espectro de resistência obtidos com genes de quitinase de *Trichoderma* podem superar a limitada eficácia observada pela transformação de plantas com genes oriundos de vegetais ou de bactérias. Estes resultados demonstraram que fungos micoparasitas podem ser uma fonte rica de genes para uso no controle de doenças de plantas (LORITO et al., 1998).

Organismos produtores de quitinase são usados na agricultura como agentes efetivos de biocontrole contra inúmeros fungos fitopatogênicos. Experimentos envolvendo transformação com genes codificando quitinases de *Trichoderma spp* têm sido realizados a fim de aumentar a capacidade de produção destas enzimas em alguns organismos. Giczey et al. (1998) transformaram *T. hamatum* com um gene que codifica uma endoquitinase de 42 kDa, *tham-ch*, obtido por “screening” de uma biblioteca genômica de *T. hamatum* linhagem Tam 61, utilizando uma seqüência de quitinase amplificada por PCR a partir do genoma do próprio fungo. O gene *tham-ch*, com sua própria seqüência regulatória foi reintroduzido dentro de um hospedeiro da mesma linhagem, mas a integração da construção no genoma foi estável somente para uma cópia. Mesmo assim, os transformantes apresentaram elevados níveis de atividade quitinolítica em comparação com a linhagem selvagem. Enquanto Margolles-Clark et al. (1996) isolaram um gene de endoquitinase de *T. harzianum* e utilizaram-no para a transformação de uma linhagem de *T. reesei*, que não possui qualquer atividade endógena de quitinase, tornando-a capaz de produzir elevados níveis de endoquitinase sob o controle do promotor do gene de celulase *cbh1*. Devido a grande quantidade de celulases produzidas pelo mutante de *T. reesei*, a mistura de enzimas produzidas pelo fungo geneticamente modificado apresentou grande eficiência contra um amplo espectro de fungos fitopatogênicos em ensaios *in vitro*, incluindo oomicetos, que possuem celulose como principal componente da parede celular. Dessa forma, a duplicação do número de cópias de genes para endoquitinases poderá se constituir em uma excelente estratégia para aumentar a eficiência de espécies de *Trichoderma* para o controle biológico de fitopatógenos.

3. METODOLOGIA

3.1. Análise de seqüências

As seqüências identificadas no banco genômico de *C. pernicioso* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>) foram analisadas utilizando softwares específicos disponíveis em sites gratuitos. Para as análises de similaridade de seqüências, foi utilizado o BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A tradução das seqüências de aminoácidos, análises de domínios e regiões conservadas, além do alinhamento de seqüências, foram obtidos utilizando ferramentas do Expasy (<http://au.expasy.org/tools/dna.html>). O dendograma foi construído com o programa ClustalX e visualizado no programa Treeview, cujos *downloads* foram feitos nos endereços <http://www.crc.dk/dnatools/> e <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>, respectivamente.

3.2. Cultivo de *Crinipellis pernicioso*

3.2.1. Cultivo de *Crinipellis pernicioso* em meio líquido

O *C. pernicioso* foi inoculado em meio líquido contendo 1% (p/v) de glicose, 0,1% (p/v) de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,02% (p/v) de KCl, 0,02% (p/v) de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5% (p/v) de extrato de levedura, 0,001% (p/v) de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 0,001% (p/v) de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, e incubado a 25° C sem agitação por um período de oito a quinze dias.

3.2.2. Cultivo de *Crinipellis pernicioso* em sistema artificial (bolachas)

C. pernicioso foi cultivado em sistema artificial como descrito por Niella et al. (1999). O isolado 1189 obtido no CEPEC/CEPLAC foi inoculado em placas contendo meio BD (batata 20% e dextrose 2%) e incubado em BOD a 25°C por 15 dias. Após este período de incubação, discos de micélio foram utilizados para inocular bolachas constituídas de vermiculita (38,6%), gesso (11,6%), farelo de trigo (48,4%), calcário (1,4%) e H₂O suficiente para atingir o ponto de saturação. A cultura foi mantida a uma temperatura de 21-25°C, com 100% de umidade e regime de luz de 12 horas até que o micélio recobrisse toda a bolacha (aproximadamente 15 dias). As bolachas foram então cobertas com terriço de cacau autoclavado, e incubadas por mais 15 dias até que o micélio recobrisse novamente toda a bolacha, e foram penduradas no vassoueiro nas mesmas condições de temperatura, umidade e luz que foram descritas anteriormente (Figura 6).

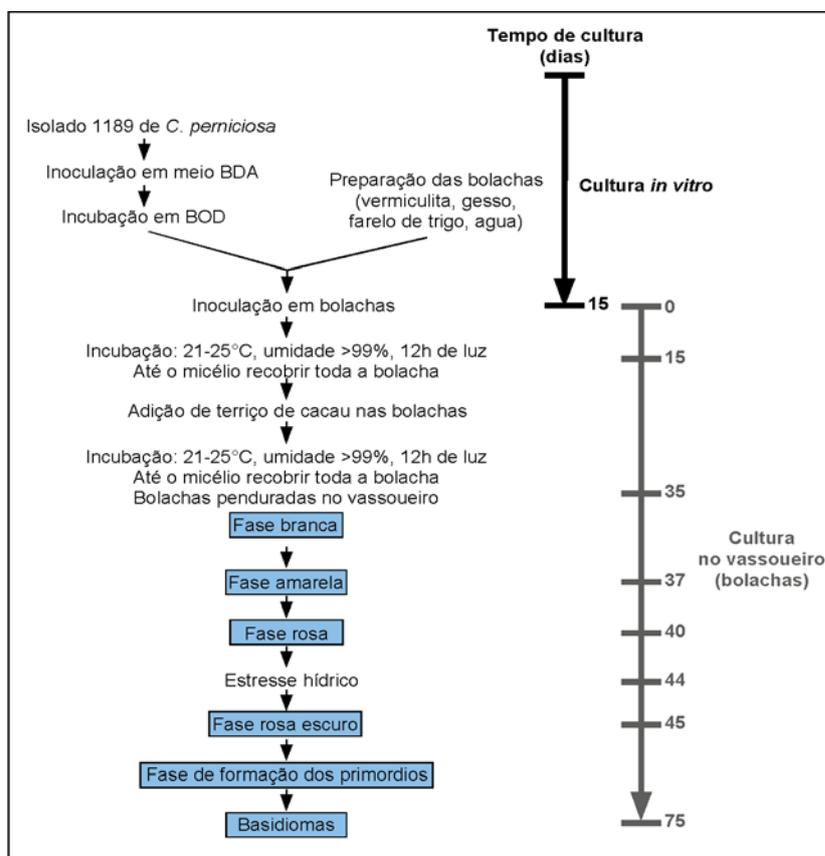


Figura 6 - Processo de cultura de *Crinipellis pernicioso* *in vitro* e em bolachas. Em azul são representadas as fases de coleta do *C. pernicioso*.

Seis diferentes fases do desenvolvimento do fungo foram estudadas: i) fase branca: corresponde a fase inicial de cultivo quando as bolachas apresentavam um micélio de cor branca (35 dias); ii) fase amarela: quando o micélio apresentou a primeira mudança na coloração passando a exibir uma cor amarela (37 dias); iii) fase rosa: em que ocorreu a segunda mudança de cor com o micélio apresentando uma cor rosa (40 dias); iv) fase rosa escuro: logo após o estresse hídrico; v) fase de primórdio: quando as bolachas apresentaram a formação de primórdios; e vi) basidioma; quando os corpos de frutificação estavam completamente desenvolvidos (Figura 7).

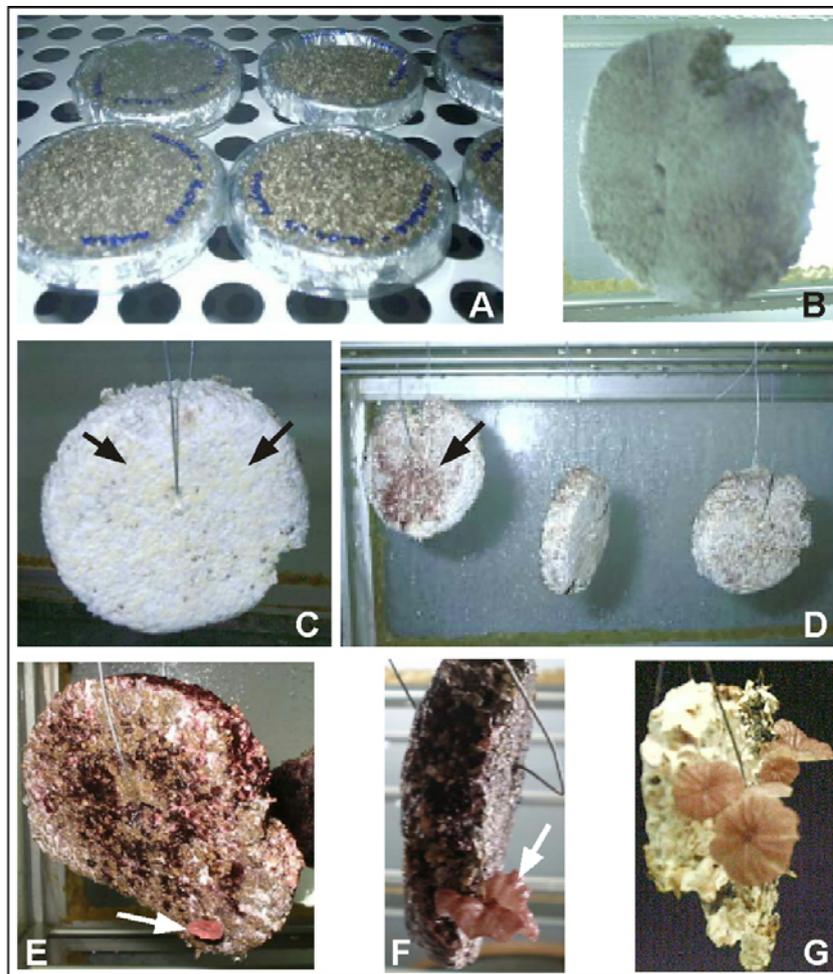


Figura 7 - Fases do desenvolvimento do *Crinipellis pernicioso* cultivado em sistema artificial (bolachas).

A. Bolachas antes da inoculação com o *C. pernicioso*. B à G. Fases do desenvolvimento do *C. pernicioso* em bolachas penduradas no vassoueiro. B. Fase micelial branca. C. Fase micelial amarela (setas). D. Fase micelial rosa (seta). E. Fases micelial rosa escuro, dos primordios e do inicio da frutificação (seta). F. Primordios e basidiocarpos em formação (seta). G. Basidiocarpos formados. Fotos: Acássia Benjamin Leal Pires.

3.3. Extração de DNA genômico

O DNA foi extraído como descrito por Zolan e Pukkila (1986). O micélio de *C. perniciosus* foi macerado em nitrogênio líquido e adicionou-se 500 µL de tampão de extração (CTAB 1%, NaCl 0,7 mol.L⁻¹, Tris-HCl 20 mmol.L⁻¹, pH 8,0, EDTA 10 mmol.L⁻¹, pH 8,0, β-mercaptoetanol 1%) às alíquotas de 40 mg do macerado. Em seguida, foram adicionados 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v/v), centrifugado a 20.000 x g por 5 minutos e a fase aquosa contendo o DNA foi recolhida. O DNA foi precipitado por adição de um volume de isopropanol, incubado por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugado por 1 minuto a 20.000 x g. O precipitado de DNA foi ressuspenso em 300 µL de TE (Tris-HCl 10 mol.L⁻¹, pH 8,0, EDTA 1 mmol/L) com 100 µg/mL de RNase (livre de DNase) e incubado por 30 minutos a 37 °C para degradar os RNAs presentes. A solução de DNA foi limpa com a adição de 300 µL de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v/v), agitada, e centrifugada por 5 minutos a 20.000 x g. A fase aquosa foi recolhida adicionando-se 75 µL de CH₃COONH₄ 7,5 mol.L⁻¹ e 750 µL de etanol 95%, e incubando-se por 20 minutos a -20 °C a fim de precipitar o DNA. Após centrifugação por 1 minuto a 20.000 x g, o DNA precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a temperatura ambiente e solubilizado em 50 µL de água milli-Q. O DNA foi quantificado em gel de agarose 1% por comparação com um padrão de concentração conhecida do DNA do fago λ (50, 100, 200 e 300 ng).

3.4. Extração de RNA

A extração de RNA total foi feita utilizando-se o *RNeasy Midi Kit* da QIAGEN segundo as recomendações do fabricante. O micélio foi macerado em nitrogênio líquido e foram adicionados 5 mL de tampão RLT (fornecido pelo fabricante, contendo guanidina tiocianato e ao qual foi adicionado β-mercaptoetanol na proporção de 10 µL para cada 1 mL de tampão RLT) às alíquotas de 500 mg do macerado. A mistura foi homogeneizada vigorosamente em vortex por 5 segundos e levada ao banho-maria a 56 °C por 3 minutos. Em seguida a mistura foi centrifugada a 3.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo frasco no qual foi adicionado meio volume de etanol 96%, sendo imediatamente

homogeneizado por vigorosa agitação. A amostra foi então aplicada à coluna *RNeasy midi spin*, colocada em um tubo de centrifuga de 15 mL e centrifugada a 5.000 x g por 5 minutos. O líquido foi descartado e foram adicionados à coluna 4 mL do tampão RW1 (fornecido pelo fabricante, contendo sais de guanidina e etanol). A coluna foi centrifugada a 5.000 x g por 5 minutos para lavagem. O líquido filtrado foi descartado e 2,5 mL do tampão RPE (fornecido pelo fabricante e ao qual foram adicionados 4 volumes de etanol 96%) foram adicionados à coluna. A coluna foi centrifugada a 5.000 x g por 2 minutos para uma nova lavagem; o líquido foi descartado e mais 2,5 mL do tampão RPE foram adicionados à coluna que novamente foi centrifugada a 5.000 x g por 5 minutos para secar a membrana da coluna. Para a eluição, a coluna foi transferida para um novo tubo de centrifuga de 15 mL. Água livre de RNase foi adicionada à coluna, que foi centrifugada a 5.000 x g por 3 minutos. A eluição foi então repetida mais uma vez.

3.5. Transferência de *Southern* do gene *CpQUIT2*

A técnica de transferência de *Southern* foi realizada segundo Sambrook et al. (1989). Para marcação da sonda e detecção do sinal, utilizou-se o kit *Gene Images™ AlkPhos Direct™ Labelling and Detection System* (Amersham Biosciences), conforme as recomendações do fabricante.

Duas alíquotas de 6 µg de DNA genômico de *C. pernicioso* foram clivadas com 12 unidades das enzimas de restrição *Bam*HI ou *Pst*I. O DNA digerido foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 0,8% e corado com brometo de etídeo 0,25 µg.mL⁻¹. Após eletroforese, o gel foi incubado sob leve agitação na solução de depurinação (HCl 0,2 mol.L⁻¹) por 15 minutos, seguido de duas incubações de 30 minutos na solução de desnaturação (NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 mol.L⁻¹) e duas incubações de 30 minutos na solução de neutralização (Tris-HCl 0,5 mol.L⁻¹, pH 7,2, NaCl 1,5 mol.L⁻¹). O DNA foi transferido para membrana de náilon (Hybond N - Amersham Biosciences) por capilaridade. Para tal, nos reservatórios de uma cuba de eletroforese horizontal foram colocados SSC 20X (NaCl 3 mol.L⁻¹, citrato de sódio 0,3 mol.L⁻¹, pH 7,0). Sobre a plataforma da cuba foram colocadas três folhas de papel de filtro (3M) embebidas em SSC 20X, formando uma ponte. Sobre a ponte foram colocados, na seguinte ordem: o gel; a membrana de náilon;

três pedaços de papel de filtro umedecidos em SSC 20X; uma camada de papel toalha de 10 cm de espessura; uma placa de vidro; e um peso de aproximadamente 1 kg. Após 16 h de transferência, o aparato de transferência foi desmontado e a membrana foi lavada em SSC 2X (NaCl 0,3 mol.L⁻¹ e citrato de sódio 0,03 mol.L⁻¹, pH 7,0). O DNA foi fixado na membrana por incidência de luz UV usando o *Spectro Linker™ XL-1000 UV Crosslynker*.

A sonda foi obtida pela amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de um fragmento de quitinase de 688 pb tendo como molde o DNA genômico de *C. perniciosus* e utilizando-se dois oligonucleotídeos específicos, CHITBamHIF (5'-CCGGATCCTTTGCAAGCATTAAATC-3') e CHITXhoIR (5'-AGCTCGAGCCGCCATAAAGATTGG-3') nas seguintes condições: 94°C por 2 minutos; 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55 °C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto; 72°C por 7 minutos e 4 °C *forever*. O fragmento amplificado foi separado por gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio 0,1 µg.mL⁻¹. Em seguida, o fragmento de DNA de interesse foi isolado e purificado em gel de agarose, utilizando-se o *Kit Prep-A-Gene* (BIORAD), segundo as recomendações do fabricante. Após a separação eletroforética, a região do gel de agarose que continha o fragmento de interesse foi cortada e dissolvida em perclorato de sódio 4,5 mol.L⁻¹, a 50°C. A matriz *Prep-A-Gene* foi adicionada na relação de 5 µL de matriz para cada µg de DNA e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a adsorção do DNA à sílica, a amostra foi lavada duas vezes com tampão de lavagem (BIORED) contendo etanol 70%. O DNA foi eluído em água a 50°C por 10 minutos.

A marcação da sonda foi realizada com o kit *Gene Images Alkphos Direct Labelling and Detection System* (Amersham Biosciences), seguindo as recomendações do fabricante. Na reação foram usados 200 ng do fragmento de 688 pb contendo uma região altamente conservada do gene *CpQUIT2* desnaturado por aquecimento. A marcação ocorreu via ligação covalente da enzima fosfatase alcalina ao DNA fita simples.

A membrana foi pré-hibridizada com 0,2 mL.cm⁻² de tampão de hibridização do fabricante, com NaCl 0,5 mol.L⁻¹ e reagente de bloqueio do kit 4% (p/v), por 1 hora a 55°C. Em seguida, a sonda foi adicionada ao tampão procedendo a hibridização por 16 horas a 55°C. As lavagens da membrana foram realizadas a 55°C por duas vezes de 10 minutos em tampão contendo uréia 2 mol.L⁻¹, SDS 0,1% (p/v), NaH₂PO₄ 50 mmol.L⁻¹, pH 7,0, NaCl 150 mmol.L⁻¹, MgCl₂ 1 mmol.L⁻¹ e

reagente de bloqueio 0,2% (p/v) e por duas vezes de 5 minutos a temperatura ambiente em Tris base 50 mmol.L⁻¹, NaCl 0,1 mol.L⁻¹ e MgCl₂ 2 mmol.L⁻¹, pH 10,0.

A detecção do sinal foi realizada por degradação do substrato dioxetano, *CDP Star* (Amersham Biosciences), pela ação enzimática da fosfatase alcalina. A energia luminosa emitida foi observada por sensibilização do *Hyperfilm ECL* após 24 horas de exposição, seguida de revelação do filme auto-radiográfico.

3.6. RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*)

Os cDNAs foram sintetizados utilizando a transcriptase reversa *RevertAidTMH Minus M-MuLV* (Fermentas). As alíquotas de RNA total foram tratadas com DNase I (Fermentas) e as reações de transcrição reversa foram feitas utilizando-se 10µL de RNA total como molde, 2,5 mmol.L⁻¹ de cada dNTP, 20u de inibidor de RNase, 0,5 µg de primer oligo(dT) e 200u de *RevertAidTMH Minus M-MuLV*. A reação foi incubada a 42°C por 60 minutos. A transcriptase reversa foi inativada a 70°C por 10 minutos.

Com o objetivo de padronizar os volumes de cDNA a serem utilizados nas análises de expressão do gene, 1µL de cada da reação foi utilizado para amplificação por PCR do gene de actina (gene constitutivo obtido do seqüenciamento do genoma do *C. pernicioso*) utilizando primers específicos: ActinaCPF (5'- CCACAATGGAGGACGAAGTCG-3') e ActinaCPR (5'- CCGGACATAGGAGTCCTTCTG-3') nas seguintes condições: 94°C por 3 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e 20 segundos; 72°C por 5 minutos e 15°C *forever*. A análise quantitativa foi feita por densitometria, utilizando o software *Kodak Digital ScienceTM ID Image Analysis* através da captura de imagem dos produtos de RT-PCR. Os produtos de RT-PCR de actina das amostras de RNA total foram utilizados como controle interno do RT-PCR. O número de ciclos empregado para a amplificação do gene de actina foi testado em reações independentes variando o número de ciclos (Figura 8). Após a padronização, os primers CHITBamHIF (5'-CCGGATCCTTTGCAAGCATTAATC-3') e CHITXhoIR (5'-AGCTCGAGCCGCCATAAAGATTGG-3'), foram utilizados para detectar os níveis de expressão de *CpQUIT2* durante as diferentes fases de desenvolvimento de *C. pernicioso*.

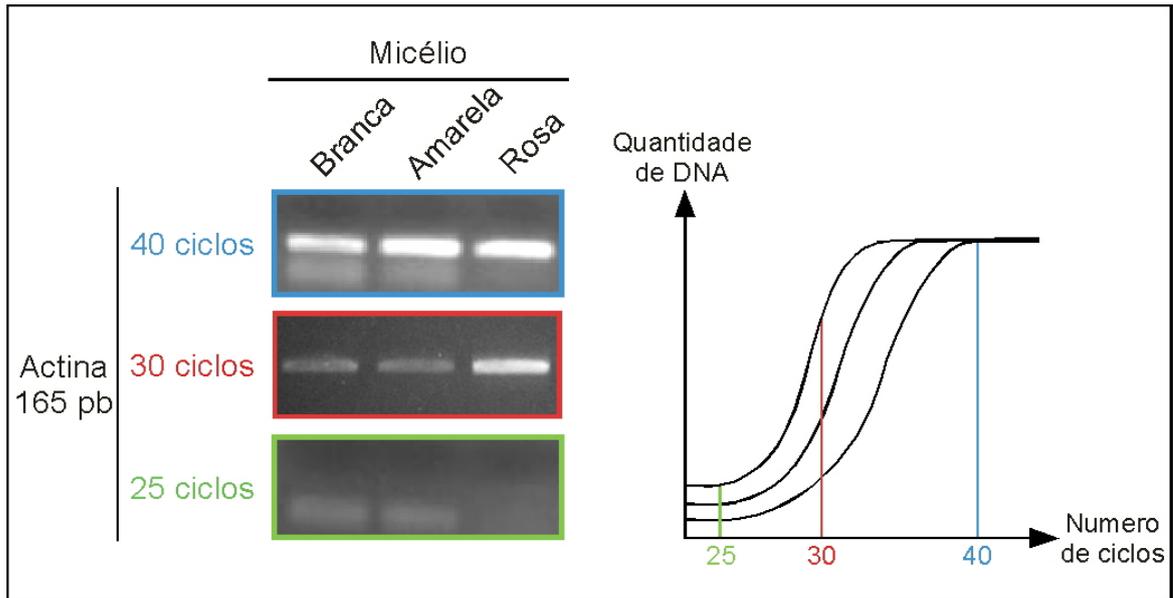


Figura 8 - RT-PCR semi-quantitativo: normalização pela amplificação do gene da actina.

O número de ciclos utilizado para a normalização do RT-PCR (30 ciclos) foi escolhido baseado nas curvas de calibração obtidas com 25, 30 e 40 ciclos em três amostras (fases branca, amarela e rosa do desenvolvimento do fungo).

4. RESULTADOS

4.1. Análise de seqüências de quitinases de *Crinipellis pernicioso*

Dentro do banco de dados montado a partir do seqüenciamento de uma biblioteca genômica e da anotação de genes de *C. pernicioso* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>) foram identificadas seqüências de possíveis fragmentos de genes de quitinases. O alinhamento destas seqüências permitiu a formação de 17 *contigs* (seqüências maiores formadas pelo agrupamento de seqüências que apresentaram sobreposição), que após a comparação de suas seqüências nucleotídicas com seqüências já depositadas em banco de dados público *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando o programa BLAST, confirmaram a similaridade com seqüências de quitinases de outros organismos (Tabela 2). Os *contigs* foram em média formados por 4 seqüências e alcançaram entre 647 e 1983 pb. Cerca de 76,5% dos *contigs* apresentaram similaridade com quitinases de fungos, sendo 53,8% destes similares a uma endoquitinase de *Amanita muscaria*. Um *contig* apresentou similaridade com uma quitinase de classe I pertencente à família 19 das glicosil hidrolases até aqui só encontrada em plantas e em algumas espécies de bactérias. Dois *contigs* apresentaram similaridade com hexosaminidases que são enzimas que degradam oligômeros de quitina.

Nenhum dos *contigs* formados representou um gene de quitinase inteiro, e em apenas dois *contigs* foram encontradas regiões sem códons de terminação. Esses *contigs*, nº17 e 7, foram escolhidos para posterior estudo de genes de quitinase de *C. pernicioso*. Os *primers* ChitSal1 F(5'-GCCGTCGACACGGCTAACTTGC-3') e ChitHindIII R (5'-GTGAAGCTTCCTAAAAGAACTG-3') foram desenhados a partir da análise do *contig* 17 e amplificaram um fragmento de 559 pares de bases que foi

Tabela 2 – Resultado da análise do BLAST para os 17 *contigs* de quitinase de *Crinipellis pernicioso*. **Contig* que deu origem a *CpQUIT1*. ***Contig* que deu origem a *CpQUIT2*.

<i>Contig</i>	Nº de seqüências por <i>contig</i>	Tamanho (pb)	Gene / Organismo	E-value	Classe	Nº de acesso
1	02	970	Endoquitinase / <i>Amanita muscaria</i>	2e-11	V	AJ276119.1
2	02	1625	Precursor beta-hexosaminidase / <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	9e-49	-	AE017346.1
3	02	1295	Endoquitinase/ <i>A. muscaria</i>	2e-32	V	AJ276119.1
4	02	898	Endoquitinase/ <i>A. muscaria</i>	9e-08	V	AJ276119.1
5	02	1045	Endoquitinase/ <i>A. muscaria</i>	9e-30	V	AJ276119.1
6	03	1022	N-acetilhexosaminidase / <i>Hypholoma fasciculare</i>	2e-33	-	AY615427.1
7**	03	973	Quitinase / <i>Aspergillus nidulans</i>	6e-64	V	D87063.1
8	03	1011	Quitinase / <i>Entamoeba invadens</i>	1e-14	V	U78320.1
9	04	647	Endoquitinase/ <i>A. muscaria</i>	5e-18	V	AJ276119.1
10	04	1159	Endoquitinase/ <i>A. muscaria</i>	2e-32	V	AJ276119.1
11	04	908	Quitinase / <i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	3e-4	I	JC7535
12	04	1084	Quitinase / <i>Rhizopus niveus</i>	1e-29	III	S36931
13	05	1284	Quitinase / <i>A. nidulans</i>	2e-32	V	D87063.1
14	06	677	Quitinase / <i>A. nidulans</i>	1e-29	V	D87063.1
15	06	872	Quitinase / <i>A. nidulans</i>	2e-65	V	D87063.1
16	10	1164	Endoquitinase-P / <i>T. pseudokoningii</i> .	6e-39	V	AB041756.1
17*	10	1983	Endoquitinase / <i>A. muscaria</i>	5e-52	V	AJ276119.1

denominado *CpQUIT1*, enquanto os *primers* Chitbamh1 F (5'-CCGGATCCTTTGCAAGCATTAAATC -3') e Chitxho1 R (5'-AGCTCGAGCCGCCATAAAGATTGG-3') foram desenhados a partir do *contig* 7 e amplificaram um fragmento de 688 pb denominado *CpQUIT2*. *CpQUIT1* codifica uma seqüência de 177 aminoácidos de 21 kDa e ponto isoelétrico putativo de 5,02 enquanto *CpQUIT2* codifica uma seqüência de 183 aminoácidos de 18,87 kDa e ponto isoelétrico putativo de 7,91. Em *CpQUIT1* foram identificados dois supostos sítios de N-glicosilação do tipo Asn-X-Ser/Thr (onde X representa qualquer amino ácido exceto a prolina e ácido aspártico (LEROUGE; FAYE, 1996), e em *CpQUIT2* um sítio ativo característico das quitinases da família 18 das glicosilhidrolases (Figuras 9, 10 e 11).

```

1   GCCGTCGACACGGCTAACTTGTCTGCTGTTCCCTTCAGGAACTCCGAAAGGAC
1   A V D T A N L L L F L Q E L R K D
52  CCTGTTGGCGCTAAAATGATTTTGAGTGTACTGGCAATATCGTGCCTGG
18  P V G A K M I L S A T G N I V P W
103 ACCGATGCCAATGGCAACCCTTCAGCCGACGTTTCTGCCTTCGGAAAAGTC
35  T D A N G N P S A D V S A F G K V
154 TTGGATCACGTCACCCCTCTACTCTACGACGTCTGGGGAAGCTGGAGTGAC
52  L D H V T P L L Y D V W G S W S D
205 TCCGTTGGCCCCAATTCCCTCTGAACGACACTTGCCTGCTCCCGACAAA
69  S V G P N S P L N D T C A A P D K
256 CAGCAAGGATCCGTCGTTTTCAGCTGTAGCCAAGTGGAAACAAGGCCGGTATC
86  Q Q G S V V S A V A K W N K A G I
307 CCACTCGAGAAGATTGTGCTCGGCGTCCGTGCATACGGACACGCATTACAGC
103 P L E K I V L G V G A Y G H A F S
358 GTTAAACAAGACAAAAGCATACGTCAACGGGACCAAAGAAGTTGCTGTATAC
120 V N K T K A Y V N G T K E L A A Y
409 CCACCTTTCAACAAGGACATCCATCCCAAGGGCGACAAGTGGTATGACCCC
137 P P F N K D I H P K G D K W Y D P
460 GCCGGTGTGACCCATGTGGTGTGTTACTCCTGATGGTGGTAAGTATATA
154 A G V D P C G A V T P D G G K Y I
509 GCTACTACATATCGTAGACGCTCTTAACAGTTCTTTTAGGAAGCTTAC
171 A T T Y R R R S * Q F F * E A S

```

Figura 9 - Sequências nucleotídica e protéica do gene *CpQUIT1*.

Os potenciais sítios de N-glicosilação são indicados em vermelho. Os símbolos * representam os códons de parada.

```

5' -CCGGATCCCTTTGCAAGCATTAAATC-3'
1   CCGAATCCCTTTGCAAGCATTAAATCCCGAAACGGGCGAGGTCCAGCTTTCTG
1   E S F A S I N P E T G E V Q L S D
52  ATAAATGGGCTGATCAAGAAATCCACTACGACGGTGATACATGGGATGAAG
18  K W A D Q E I H Y D G D T W D E E
103 AAGGAAATAACCTATACGGGAATTTGAAGGCTCTCTACAACCTGAAGAAGG
35  G N N L Y G N L K A L Y N L K K E
154 AACATCGTCATTTGAAGGTTATGATCTCTATTGGTGGATGGTCATATTCCT
52  H R H L K V M I S I G G W S Y S S
205 CTTCCCTTCACCCTGTGTTGTCTCTCCTGAGCGCAGGAGAAAGTTTGTGG
69  S L H P V V V S P E R R R K F V E
256 AGAGCGCAGTGGCCCTATTGGAAGATTACGGTCTAGATGGCCTCGATGTCG
86  S A V A L L E D Y G L D G L D V D
307 ACTATGAATTTCCCTCAGGATGATGAACAGGCGTTGGGATATGTACAGTAC
103 Y E F P Q D D E Q A L G Y V Q L L
358 TCAAAGAGCTCAGAGAGGCTTTGGACGAGCATGCGAGAACCAAGGAAATCG
120 K E L R E A L D E H A R T K E I D
409 ACTATCGCTTTTTGCTCACGGTTGGTTCCCTTCCCAAAGGTTAGTATTTG
137 Y R F L L T V G F P S Q R L V F G
460 GTTCGTCTCAATATCTTTACAGATCGCTGCACCGTGCAGTTCAGACAATTA
154 S S Q Y L Y R S L H R A V Q T I I
511 TAATCGACTTCGTATCAGCGAGATGGATCAGTATCTCGATTTTGGAAACAT
171 I D F V S A R W I S I S I F G T *
562 GATGGCGTACGACTTTGGTAGGTGTTTCGTAATGTCTTGCTGGCAGTCTCT
188 W R T T L V G V R N V L L A V L F
613 TTTGACATGGCAAGTCCAGCTGGTTCCCTGGGACAGTGGTTCTGGACACCAA
205 * H G K S S W F L G Q C F W T P I
3' -GGTTAGAAATACCGCCGAGCTCGA-5'
664 TCCAATCTTTATGGCGGCTCGAGCT
222 Q S L W R L E

```

Figura 10 - Sequências nucleotídica e protéica do gene *CpQUIT2*.

O sítio catalítico conservado é indicado em vermelho. Em azul são indicados os *primers* utilizados para o RT-PCR e para a amplificação da sonda utilizada no experimento de transferência de *Southern*.

A comparação das seqüências nucleotídicas de *CpQUIT1* e *CpQUIT2* com seqüências do *GenBank* confirmou a similaridade com seqüências de quitinases de fungos que guardam semelhança com quitinases bacterianas (classe V), sendo a maior similaridade encontrada com quitinases de outros basidiomicetos. *CpQUIT1* apresentou similaridade de 60% com uma endoquitinase de *Amanita muscaria* (número de acesso AJ276119) enquanto *CpQUIT2* apresentou 80% de similaridade com uma quitinase de *Grifola umbellata* (número de acesso AF380832). O alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas de *CpQUIT1* e *CpQUIT2* com quitinases de outros fungos permite observar que *CpQUIT2* apresenta um domínio catalítico com regiões conservadas (Figura 11).

A construção de um dendograma baseado nas seqüências de quitinases que apresentaram similaridade com as seqüências de *C. pernicioso* utilizando o programa ClustalX (THOMPSON et al., 1997) mostrou o agrupamento de *CpQUIT1* e *CpQUIT2* com as quitinases de basidiomicetos, confirmando assim a similaridade existente entre elas, enquanto dois outros grupos foram formados com quitinases de ascomicetos (Figura 12).

4.2. Detecção do número de cópias gênicas de quitinase de *Crinipellis pernicioso*

O DNA genômico de *C. pernicioso* foi digerido com enzimas de restrição que não clivam a seqüência do gene *CpQUIT2* de *C. pernicioso*. Após fracionamento em gel de agarose 0,8% e transferência para membrana de náilon, o DNA foi sondado com um fragmento de 688 pb de *CpQUIT2* que apresenta regiões conservadas do domínio catalítico de quitinases. A hibridização em condições de baixa estrigência conduziu a identificação de apenas uma banda de diferentes tamanhos em cada digestão do DNA o que indica que *C. pernicioso* deve possuir apenas uma cópia do gene *CpQUIT2* (Figura 13).

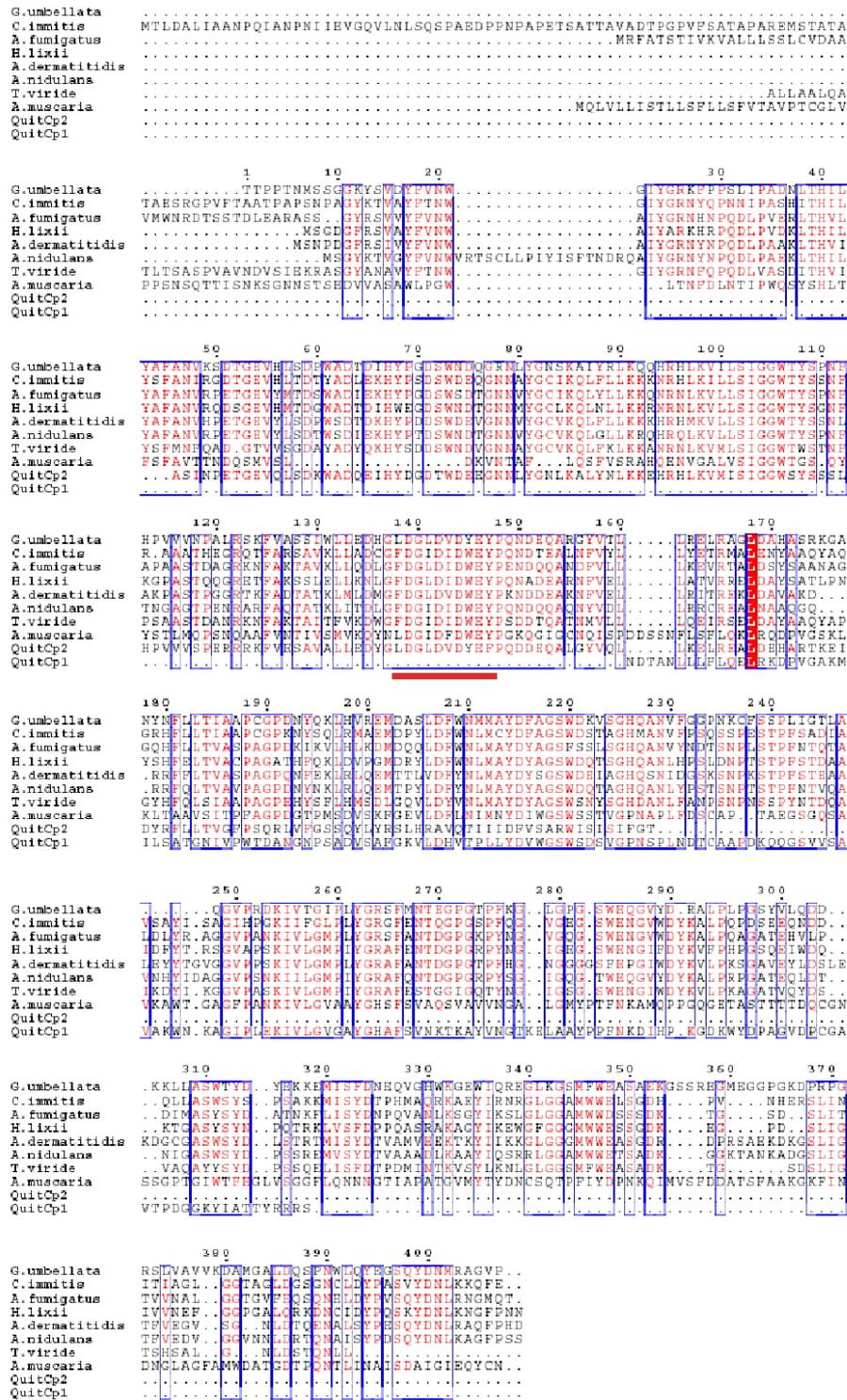


Figura 11 - Alinhamento de quitinasas de fungos.

O alinhamento foi construído usando o programa Multialin. Os números de acesso (EML-Genbank) das sequências utilizadas são: AAP804521, *Coccidioides immitis*; AAT477131, *Ajellomyces dermatitidis*; BAA35140, *Aspergillus nidulans*; AAO61686, *Aspergillus fumigatus*; AAT4771311, *Hypocrea lixii*; AAF196211, *Trichoderma viride*; AAO42981, *Grifola umbellata*; AJ276119, *Amanita muscaria*. A região sublinhada em vermelho corresponde ao sítio ativo da enzima.

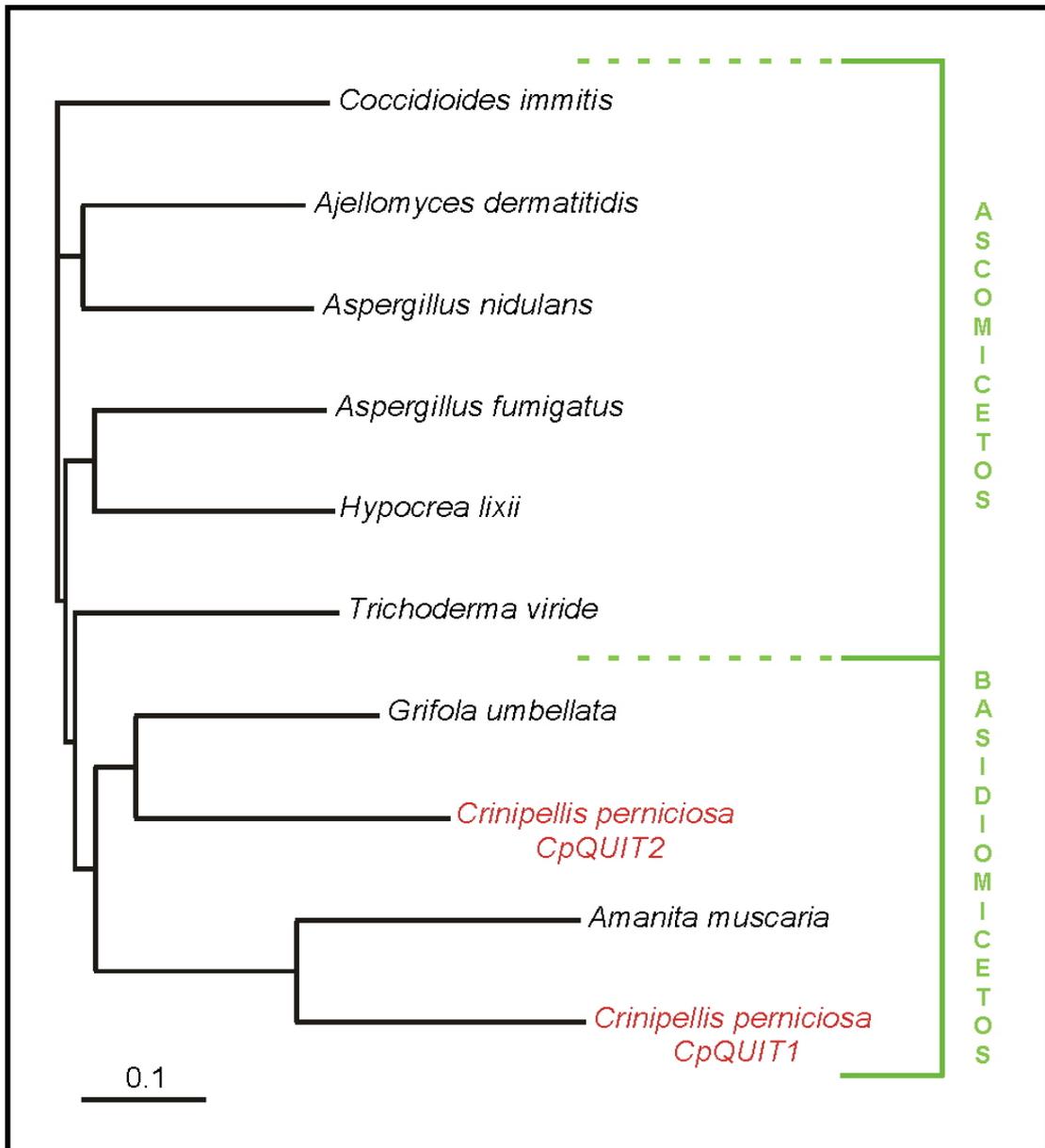


Figura 12 - Dendrograma de quitinases de fungos.

O dendrograma foi construído usando o programa ClustalX e foi visualizado no programa Treeview. Os números de acesso (EML-Genbank) das sequências utilizadas são: AAP804521, *Coccidioides immitis*; AAT477131, *Ajellomyces dermatitidis*; BAA35140, *Aspergillus nidulans*; AAO61686, *Aspergillus fumigatus*; AAT4771311, *Hypocrea lixii*; AAF196211, *Trichoderma viride*; AAO42981, *Grifola umbellata*; AJ276119, *Amanita muscaria*.

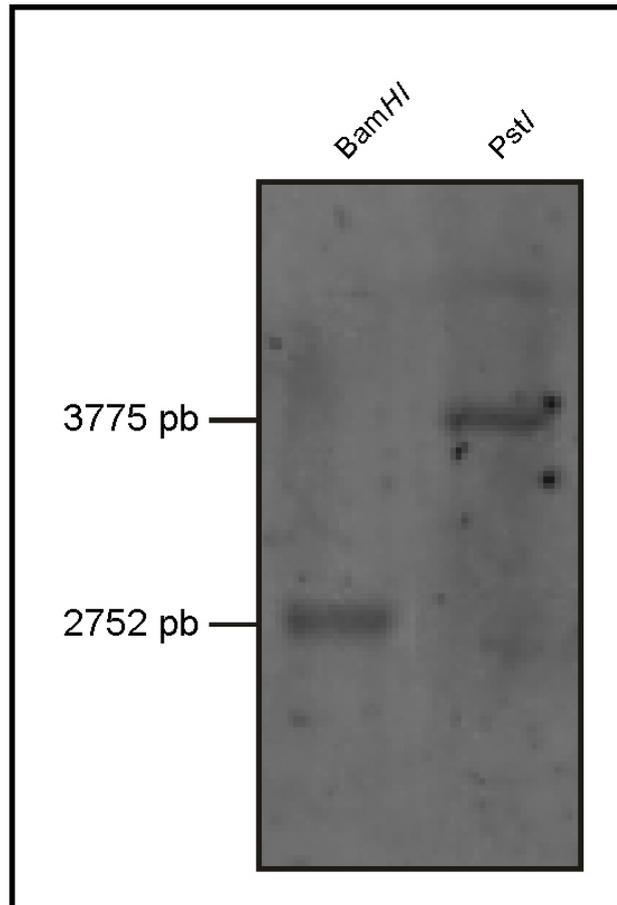


Figura 13 - Transferência de *Southern* do gene *CpQUIT2*.

O DNA foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Pst*I. O tamanho dos fragmentos é indicado à esquerda.

4.3. Análise da expressão do gene *CpQUIT2* em diferentes fases de desenvolvimento de *Crinipellis pernicioso*.

O padrão de expressão do gene de quitinase *CpQUIT2* durante as diferentes fases de desenvolvimento do *C. pernicioso* foi determinado a partir da amplificação por PCR de cDNA específico de cada fase de desenvolvimento do fungo cultivado em sistema artificial (bolachas). Uma banda de 688 pb foi observada em gel de agarose em todas as fases de desenvolvimento analisadas (Figura 14A). Observou-se que nas fases iniciais do desenvolvimento (fases branca e amarela) a intensidade da banda foi menor do que a observada na fase rosa, que é a fase que apresentou a banda de maior intensidade enquanto nas fases finais do desenvolvimento (fase

rosa escuro, primórdios e basidioma) há uma redução na intensidade das bandas observadas em relação à intensidade observada na fase rosa. A análise por densitometria dos produtos de PCR confirma que a expressão de *CpQUIT2* aumenta com o decorrer das fases do desenvolvimento e atinge o maior nível de expressão durante a fase rosa e decai nas fases finais do desenvolvimento, mas mantendo-se, contudo, maior do que durante as fases branca e amarela. (Figura 14B).

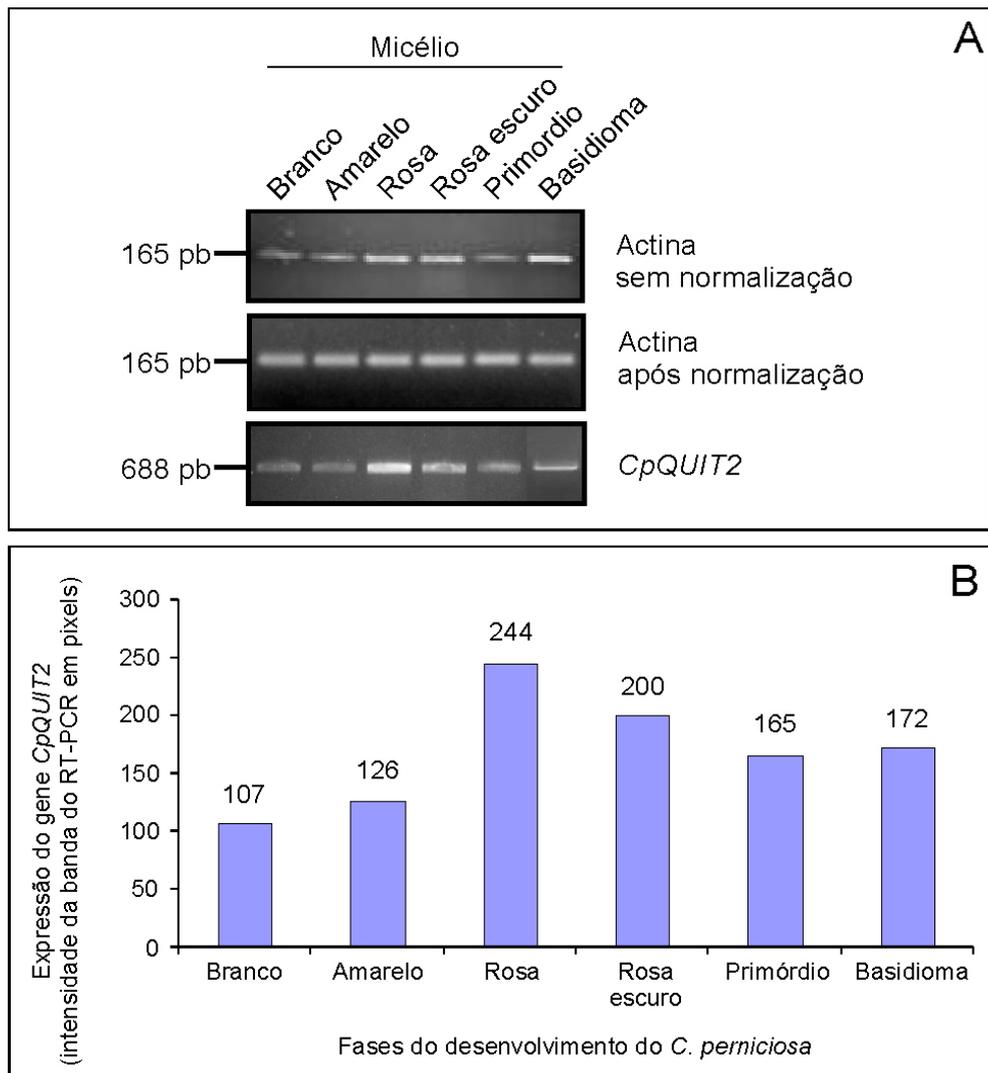


Figura 14 - Expressão do gene *CpQUIT2* na diferentes fases do desenvolvimento do *Crinipellis perniciosa*.

A. RT-PCR do gene *CpQUIT2*. A quantidade de cDNA usada para a amplificação do gene *CpQUIT2* foi normalizada pela análise densitométrica do gene da actina. As amplificações PCR foram feitas usando 30 ciclos. B. Quantificação da expressão do gene *CpQUIT2* por densitometria utilizando o software *Kodak Digital Science ID™ Image Analysis*.

5 . DISCUSSÃO

5.1. O sistema quitinolítico de *Crinipellis pernicioso* é constituído por quatro diferentes classes de quitinase

Todas as quitinases já descritas para fungos pertencem à família 18 das glicosil hidrolases de acordo com a classificação de Henrissat e Bairoch (1993). Análises recentes mostram que os produtos dos genes de quitinases fúngicas podem ser divididos em duas subclasses baseadas em suas estruturas primárias e na similaridade entre as seqüências de outras quitinases da família 18, quitinases da classe de plantas (Classe III) e quitinases da classe de bactérias (Classe V). As quitinases da classe de plantas estão presentes em todos os fungos já estudados até aqui, exceto em *Aphanocladium album*. As quitinases da classe de bactérias têm sido relatadas em fungos filamentosos, mas não em leveduras (TAKAYA et al., 1998a). Dentro do sistema quitinolítico de *T. harzianum*, genes codificando três diferentes classes de enzimas envolvidas na degradação de quitina têm sido relatados: *ech42* que codifica uma endoquitinase de classe V, *Chit33*, que codifica uma quitinase similar a quitinases de plantas relacionadas a patogênese (LIMÓN et al., 1995; DANA et al., 2001) e *nag1*, que codifica uma N-acetil- β -D-glicosaminidase (MACH et al.1999). As N-acetil- β -D-glicosaminidases são hexosaminidases que pertencem a família 20 das glicosil hidrolases (HENRISSAT, 1991; HENRISSAT; BAIROCH, 1993), e que clivam oligômeros de quitina originados de uma degradação previa de quitina por endoquitinases. Por isso são muitas vezes também chamadas de quitinases (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998).

O sistema quitinolítico de basidiomicetos é pouco conhecido e poucas enzimas têm sido caracterizadas. Quatro classes de quitinases foram identificadas no banco genômico de *C. pernicioso*. Apenas um dos *contigs* formados apresentou similaridade com quitinase da classe III. Genes que codificam quitinases desta classe como *CTS1* em *S. cerevisiae* e *ChiA* em *A. nidulans* tiveram função no crescimento e na morfogênese dos fungos comprovado por Kuranda & Robbins (1991) e por Takaya et al (1998b). A grande maioria dos *contigs* de *C. pernicioso* apresentou similaridade com quitinases da classe V de diversos organismos principalmente com uma endoquitinase do basidiomiceto *A. muscaria*. A similaridade das quitinases de classe V de *C. pernicioso* com quitinases de outros basidiomicetos é confirmada pelos resultados da análise de similaridade de *CpQUIT1* e *CpQUIT2*. (Figura 13). Nenhum papel morfogenético foi descrito para quitinases de classe V. Contudo, o nocaute de genes que codificam enzimas desta classe como *ChiB1* em *A. fumigatus*, não afetou o crescimento e a morfologia dos mutantes. Linhagens “selvagens” cultivadas em meios com 4MU-(GlcNac)₂ e 4MU-(GlcNac)₃ como substrato apresentaram, contudo, níveis de atividade lítica muito superior a atividade detectada em culturas de mutantes. Isto sugere claramente que *ChiB1* é secretado no meio de crescimento em resposta a diminuição de nutrientes indicando que o principal papel destas enzimas é a degradação e a reciclagem da quitina durante a autólise do fungo (JAQUES et al., 2003). Dois *contigs* apresentando similaridade com hexosaminidases indicam que estas enzimas também estão presentes em *C. pernicioso*, assim como em outros fungos. As hexosaminidases são enzimas citosólicas que se acumulam intercelularmente durante a fase estacionária do desenvolvimento dos fungos e degradam polissacarídeos durante a diminuição das reservas nutricionais (WHITE et al., 2002). Uma das seqüências de quitinases de *C. pernicioso* apresentou similaridade com uma quitinase de classe I que pertence a família 19. Quitinases de família 19 ocorrem quase exclusivamente em plantas exceto por poucas quitinases descritas para algumas espécies de *Streptomyces* como a quitinase C de *S. griseus* (OHNO et al., 1996). Até o presente momento nenhuma quitinase desta família foi descrita para fungos.

Os resultados da análise das seqüências de quitinases indicam que *C. pernicioso* pode possuir um sistema quitinolítico diferente do encontrado em outros fungos. Para entender o sistema quitinolítico deste fungo é preciso esclarecer as

funções individuais das enzimas envolvidas na degradação de quitina, a relação entre estrutura e função e a regulação da expressão destes genes.

5.2. *Crinipellis pernicioso* possui uma única cópia do gene *CpQUIT2*

Genes de quitinase estão presentes em múltiplas cópias no genoma de vários fungos. Dois diferentes genes de quitinase já foram isolados e clonados em *R. oligosporus* por Takaya et al. (1998b). Em *Candida albicans* existem pelo menos quatro genes de quitinases, enquanto *S. cerevisiae* possui apenas um (SELVAGGINI et al., 2004).

As quatro diferentes classes de enzimas envolvidas na degradação de quitina encontradas no banco genômico de *C. pernicioso* contêm pelo menos uma cópia gênica para cada classe de quitinase no genoma deste fungo. A transferência de *Southern* realizada utilizando *CpQUIT2* (que possui regiões conservadas de quitinases de classe V) (Figura 10), como sonda detectou a presença de apenas uma banda, revelando a existência de apenas uma cópia do gene *CpQUIT2* (Figura 13). A ausência de outras bandas muito provavelmente deve-se a baixa similaridade entre as seqüências das diferentes classes de quitinases encontradas dentro do sistema quitinolítico de *C. pernicioso*, embora a transferência de *Southern* tenha sido realizada em condições de baixa estrigência. Uma outra transferência de *Southern* está sendo feita com enzimas que clivam dentro do gene *CpQUIT2*, visando verificar a possibilidade de existência de cópias deste gene organizadas em *tandem* no genoma do *C. pernicioso*.

5.3. A expressão do gene *CpQUIT2* de *Crinipellis pernicioso* pode ser disparada por redução de carbono e nitrogênio.

Em *C. pernicioso*, a expressão do gene *CpQUIT2* de quitinase foi observada no fungo cultivado em bolachas. As fases iniciais do cultivo foram denominadas branca, amarela e rosa referente a cor que o micélio apresenta em cada uma destas fases. A fase rosa escuro, também uma referência à cor do micélio, representa uma fase de transição entre as fases iniciais e as fases finais do desenvolvimento,

caracterizadas pela formação de primórdios e basidiomas. A análise da expressão de quitinase a partir da amplificação por RT-PCR de cada uma das fases do fungo (Figura 14A) mostrou que a expressão do gene aumentou durante a fase rosa e sofreu um decréscimo durante as fases rosa escuro, primórdio e basidioma, mas manteve-se ainda maior que a expressão observada nas fases branca e amarela (Figura 14B). Durante as fases branca, amarela e rosa, o fungo encontra-se em crescimento saprofítico e a hifa não sofre alterações estruturais. Durante a fase rosa escuro, a hifa começa a se modificar para dar origem aos primórdios e ao basidioma (Acássia Pires, comunicação pessoal).

A expressão de *CpQUIT2* foi mais baixa durante as fases branca e amarela porque durante estas fases o micélio cresce regularmente e quitinases poderiam atuar apenas para a extensão da hifa, que neste estágio do desenvolvimento não sofre alterações na parede celular (GOODAY, 1990, 1997; FLACH et al., 1992). Durante a fase rosa, o crescimento ainda se dá apenas pela extensão das extremidades da hifa. Esta fase é atingida 40 dias após as bolachas terem sido penduradas no vassoureiro. É possível que após este longo período de cultura ocorra uma escassez de nutrientes no meio. O maior nível de expressão de *CpQUIT2* observado nesta fase não estaria relacionado a extensão da hifa, mas sim com uma possível redução na disponibilidade dos nutrientes na cultura como já tem sido observado em outras espécies.

O aumento da expressão de quitinase em resposta a indisponibilidade de nutrientes tem sido relatada para genes de quitinase de *Trichoderma*. Linhagens mutantes de *T. atroviride* (*T. harzianum* P1) transformadas com uma construção do gene *ech42* (codificando uma endoquitinase CHIT42), fusionado ao gene *goxA* de *A. niger*, cultivados em meios suplementados com 0,1 e 1% de glicose ou glicerol respectivamente, apresentaram um aumento na expressão de *ech42* após 48 horas, enquanto apenas uma fraca atividade foi detectada após 24 horas. Um baixo nível de atividade foi detectado tanto após 24 horas quanto após 48 horas, quando as linhagens foram crescidas em altas concentrações destas fontes de carbono. Resultados semelhantes foram obtidos quando 0,5% de quitina coloidal foi adicionada a cada uma das fontes de carbono sem considerar a sua concentração (0,1 e 1% p/v), sugerindo que a indução de *ech42* não é alcançada com quitina, mas sim com diminuição da fonte de carbono (MACH et al., 1999). Resultado análogo foi obtido por Dana et al. (2001) para expressão do gene *chit33* de *T. harzianum*,

quando o fungo foi cultivado em meio contendo baixas concentrações de glicose (0,2%), enquanto a expressão do gene não foi percebida durante o crescimento em meio com 2% de glicose ou 2% de glicerol. O aumento da expressão de *Chit33* também foi observada em resposta a redução de nitrogênio. *T. harzianum* cultivado em meio com 2% (p/v) de glicose na presença de baixas concentrações de sulfato de amônio (0,38 mM) apresentou elevada abundância do transcrito *Chit33* que esteve ausente durante a incubação em meio contendo altas concentrações de nitrogênio. Estes genes também têm sua expressão aumentada em resposta a estresse fisiológico: *ech42* tem sua transcrição disparada por baixas temperaturas, por aumento da pressão osmótica ou pela adição de etanol (MACH et al., 1999). *Chit33* também teve sua expressão aumentada muito rapidamente quando a cultura de *T. harzianum* foi colocada a 40° ou a 4° C (DANA et al., 2001).

O aumento da expressão de quitinase em resposta a redução dos nutrientes no meio de cultivo pode estar relacionada ao processo de autólise. A autólise é uma parte natural do processo biológico de fungos filamentosos, que tem início e pode avançar ou ser retardada por fatores bióticos e abióticos (Figura 15) (WHITE et al., 2002). Em muitos casos, a autólise é também um meio de sobrevivência com parte do fungo existindo pela reciclagem de produtos líticos liberados por hidrolases, que podem ser utilizados por áreas com crescimento efetivo, que estão estendendo as extremidades das hifas. Este tipo de crescimento é chamado de crescimento oculto (*cryptic growth*) e pode ocorrer como um resultado da redução de nutrientes (Figura 16). Embora a ativação e a regulação de hidrolases autolíticas sejam complexas, os maiores grupos de hidrolases autolíticas são as proteases, glicanases e quitinases (WHITE et al., 2002).

A hipótese de o aumento na expressão de quitinase em *C. perniciosus* estar relacionado à diminuição dos níveis de nutrientes no meio de cultura pode ser confirmada pela dosagem do teor de carboidratos e nitrogênio e por cortes histológicos para observação das hifas durante as fases estudadas. Esses experimentos estão sendo realizados.

Durante a fase rosa escuro, observa-se que expressão de *CpQUIT2* ainda permanece em níveis elevados. Durante esta fase a hifa começa a se modificar para dar início à formação do basidioma. A formação do corpo de frutificação (basidioma) é o processo mais complexo no ciclo de vida de basidiomicetos. O desenvolvimento do basidioma descrito em *Cuprinus cinereus* envolve uma dramática mudança no

Causas da autólise fúngica

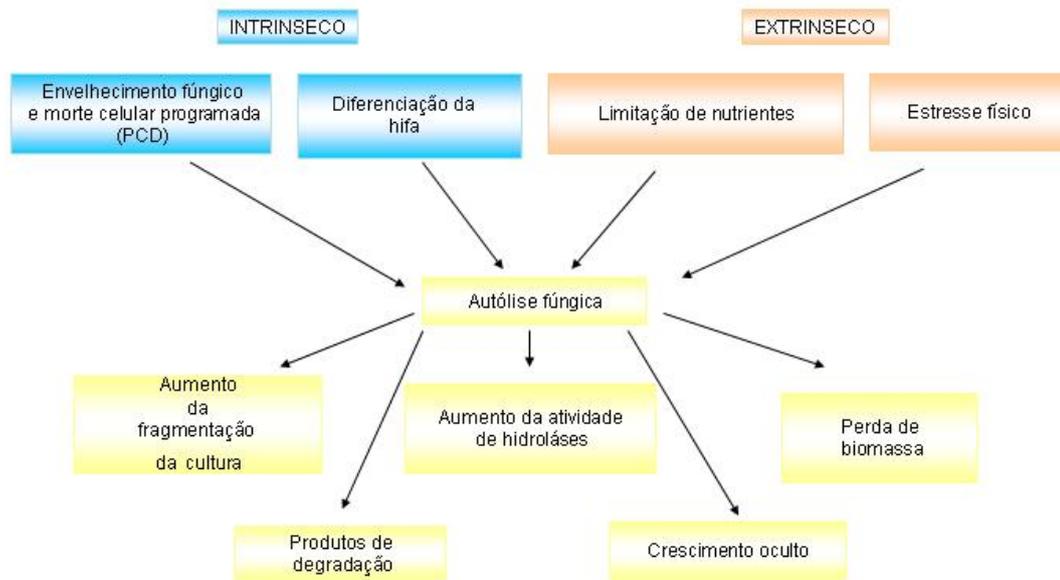


Figura 15 - Visão geral da autólise fúngica segundo White et al. (2002).

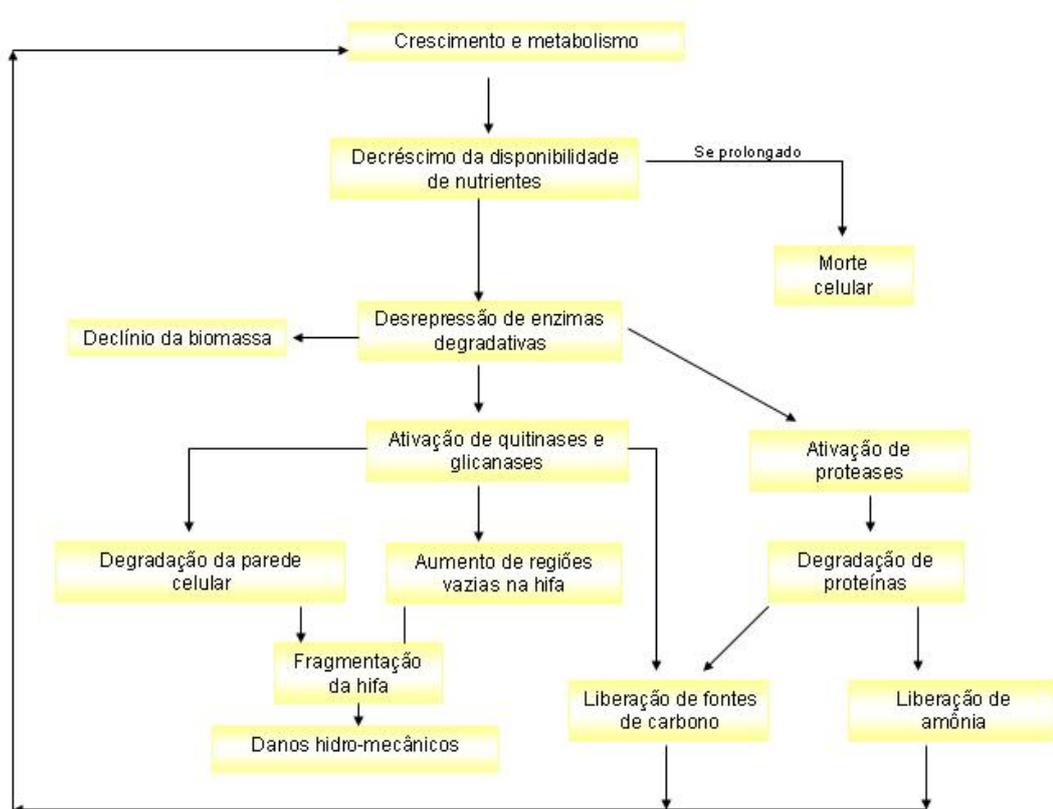


Figura 16 - Eventos associados com a autólise induzida pela redução de nutrientes, segundo White et al. (2002).

modelo de crescimento, em que a hifa passa de um crescimento tri-dimensional relativamente regular, onde se encontra como uma malha frouxa indiferenciada, para uma compacta estrutura multihifal composta de tipos celulares muito diferentes que se associam em distintas interações hifa-hifa (revisado por KÜES, 2000). Durante a fase rosa escuro ocorre o primeiro sinal de frutificação, com a ramificação da hifa e a formação de nódulos denominados de nó hifal (Acássia Pires comunicação pessoal). Em *C. cinereus* é observada uma notável redução no conteúdo de quitina nesta fase em relação à hifa vegetativa (revisado por KÜES, 2000). Os níveis de expressão de *CpQUIT2* também são significativos durante as fases de primórdio e no basidioma. Durante estas fases ocorrem modificações importantes como o alongamento da estipe e maturação do píleo. Durante o alongamento, o conteúdo de quitina no estipe permanece constante. Neste processo, as quitinases atuam juntamente com as glicanases para dar plasticidade ao estipe por meio da alternância das ligações entre quitina e glicanos (revisado por KÜES, 2000). A autólise está claramente presente no processo de maturação do corpo de frutificação (revisado por KÜES, 2000), sendo assim justificada uma maior expressão de *CpQUIT2* em níveis ainda significativos no basidioma.

Pouco se conhece sobre a biologia e principalmente sobre a genética de *C. perniciosus* que possibilite entender o seu desenvolvimento. Estudos visando identificar genes envolvidos na formação do corpo de frutificação do fungo estão sendo realizados pelo grupo do Genoma do *C. perniciosus*. Poucos trabalhos têm descrito quitinases de basidiomicetos e nenhum estudo foi desenvolvido até o momento com quitinases de *C. perniciosus*. A curto prazo, o isolamento do cDNA completo de *QuitCp2* e a expressão da proteína ativa correspondente em sistema heterólogo poderão contribuir para o estudo de atividade da enzima sobre o desenvolvimento do próprio fungo. A longo prazo, a identificação das funções das demais classes de quitinases no desenvolvimento do *C. perniciosus* e dos mecanismos que envolvem sua regulação serão de grande importância para um melhor entendimento do desenvolvimento do fitopatógeno.

6. CONCLUSÕES

O sistema quitinolítico de *Crinipellis pernicioso* é constituído por quitinases das classes III, V e uma quitinase de classe I só encontradas em plantas e bactérias, além de uma hexosaminidase.

CpQUIT1 e *CpQUIT2* pertencem a classe V das quitinases.

Crinipellis pernicioso possui apenas uma cópia do gene *QuitCp2*.

QuitCp2 pode estar envolvido no processo de autólise do fungo, em consequência de escassez de nutrientes como também durante a formação do basidioma.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDEBRHAN, T.; MADDISON, A. C.; ARIAS, R.; MAFFIA, L. A. Disease gradients of *Crinipellis pernicioso*. In: RUDGARD, S. A.; ANDEBRHAN, T.; MADDISON, A.C. (Ed.) **Disease management in cocoa: Comparative epidemiology of witches' broom disease**. London,UK, Chapman & Hall, 1993, p. 157-164.

ANJANI KUMARI J.; PANDA, T. Studies on critical analysis of factors influencing improved production of protoplast from *Trichoderma reesei* mycelium. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 14, p. 241-248, 1992.

BINDER, A.; GHOSE, T. K. Adsorption of cellulose by *Trichoderma viride*. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 19, p. 1187-1199, 1978.

BROGLIE, K. et al. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*, **Science**. v. 254, p. 1194-1197, 1991.

CHET, I; INBAR, J.; HADAR, Y. Fungal antagonists and mycoparasites. In: WICKLOW, D. T.; SÖDERSTRÖM, B. (Eds.) **The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationships**, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1997. p. 165-184.

CEITA, G. O. et al. Oxidative burst and expression of a germin/oxo gene during the programmed cell death observed in the compatible interaction *Theobroma cacao* with the hemibiotrophic fungus *Crinipellis pernicioso*. (submetido). 2005.

COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. The molecular biology of chitin digestion. **Current Opinion Biotechnology**. v. 9, p. 270-277. Review. 1998.

DANA, M. M et al. Regulation of chitinase 33 (*chit33*) gene expression in *Trichoderma harzianum*. **Current Genetics**. v. 38, p. 335-342, 2001.

DE MARCO J. L. et al. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 16, p. 383-386, 2000.

ESCOTT, G. M; HEARN, V. M; ADAMS, D. J. Inducible chitinolytic system of *Aspergillus fumigatus*. **Microbiology**. v. 144, p. 1575-1581, 1998.

FLACH, J.; PILET, F.; JOLLES P. What's new in chitinase research? **Experientia**. v. 48, p. 701-716, 1992.

FELSE, P. A.; PANDA, T. Regulation and cloning of microbial chitinase genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 51, p. 141-151, 1999.

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

GICZEY, G. et al. Homologous transformation of *Trichoderma hamatum* with an endochitinase encoding gene, resulting in increased levels of chitinase activity. **FEMS Microbiology Letter**. n. 2, v. 165, p. 247-252, 1998.

GOODAY, G. W. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. **Biodegradation**. v. 1, p. 177-190, 1990.

GOODAY, G. W. The ever-widening diversity of chitinase. **Carbohydrates Europe**. v. 19, p. 18-22, 1997.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicioso*. **Heredity**. v. 72, p. 278-289, 1994.

GRIFFITH, G. W. et al. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. **New Zealand Journal of Botany**. v. 41, p. 423-435, 2003.

HAMEL, F.; BELLEMARE, G. Characterisation of a class I chitinase gene and of wound-inducible, root and flower-specific chitinase expression in *Brassica napus*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1263, p. 212-220, 1995.

HAMEL, F. et al. Structural, and evolutionary relationships among chitinases of flowering plants. **Journal of Molecular Evolution**. v. 44, p. 614-624, 1997.

HARMAN, G. E. et al. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. **Phytopathology**. v. 83, p. 313-318, 1993.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol. **Plant Disease**. v. 84, p. 377-391, 2000.

HENRISSAT, B. Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**. v. 280, p. 309-316, 1991.

HENRISSAT, B; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**. v. 293, p. 781-788, 1993.

ITOH, Y. et al. Family 19 chitinase of *Streptomyces griseus* hut6037 increases plant resistance to the fungal diseases. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 67, p. 847-855, 2003.

JAQUES, A.K et al. Disruption of the gene encoding the ChiB1 chitinase of *Aspergillus fumigatus* and characterization of a recombinant gene product. **Microbiology**. v. 149, p.2931-2939, 2003.

KAOMEK, M. et al. Cloning, expression, and characterization of an antifungal chitinase from *Leucaena leucocephala* de Wit. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 67, p. 667-677, 2003.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases. Regulation and function. **Cellular & Molecular Biology letters**. v. 8, p. 809-824, 2003.

KISHIMOTO K. et al. Detailed analysis of rice chitinase gene expression in transgenic cucumber plants showing different levels of disease resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). **Plant Science**. v. 162, p. 655-662, 2002.

KRAMER, K. J; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 27, n. 11, p. 887-900, 1997.

KRAUSS, U.; SOBERANIS, W. Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. **Biological Control**. v. 22, p. 149-158, 2001.

KRISHNAVENI, S. et al. Purification and partial characterisation of chitinases from sorghum seeds. **Plant Science**. v. 144, p. 1-7, 1999.

KÜES, U. Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v. 64, p. 316-353, 2000.

KURANDA, M. J.; ROBBINS, P. W. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Biological Chemistry.** v. 266, p. 19758-19767, 1991.

LASS, R. A. Diseases. In: WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. (Ed.) **Cocoa.** 4th ed. London, UK, Longmans. 1985, p. 265-365.

LEROUGE, P.; FAYE, L. Recent developments in structural analysis of N-glycans from plant glycoproteins. **Plant Physiology and Biochemistry.** v. 34, p. 263-271, 1996.

LIMON, M. C. et al. Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. **Current Genetics.** v. 28, p. 478-483, 1995.

LORITO, M. et al. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan β 1,3-glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. **Phytopatology.** v. 84, p. 398-405, 1994.

LORITO, M. et al. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v. 95, n.14, p. 7860-7865, 1998.

MACH, R. L., et al. Expression of two major genes of *T. atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 65, p. 1858-1863, 1999.

MARGOLLES-CLARK, E. et al. Improved production of *Trichoderma harzianum* by expression in *Trichoderma reesei*. **Applied and Environmental Microbiology.** v.62, n. 6, p. 2145-2151, 1996.

MONREAL, J.; REESE, E. T. The chitinase of *Serratia marcescens*. **Canadian Journal of Microbiology.** v. 15, p. 689-696, 1969.

NEUHAUS J. M. et al. High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana glauca*, susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection, **Plant Molecular Biology.** v. 16, p. 141-151, 1991.

NIELLA, G. et al. Aperfeiçoamento da metodologia de produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**. v. 24, p. 523-527, 1999.

OHNO, T. et al. A modular family 19 chitinase in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. **Journal of bacteriology**. v. 178, p. 5065-5070, 1996.

ORCHARD, J. et al. Changes in morphology and measurement of cytokinin levels during the development of witches-brooms on cocoa. **Plant Pathology**. v. 43, p. 65-72, 1994.

PASSARINHO, P. A. et al. Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana* AtEP3/AtchitIV endochitinase gene. **Planta**. v. 212, p. 556-56, 2001.

PEREIRA, J. L. et al. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotropica**. v. 1, n. 1, p. 79-81, 1989.

PEREIRA, J. L.; de ALMEIDA, L. C. C.; SANTOS, S. M. Witches-broom disease of cocoa in Bahia-attempts at eradication and containment. **Crop Protection**. v. 15, p. 743-752, 1996.

PEUMANS, W. J. et al. The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acid for the synthesis of ripening-associated proteins. **Plant Physiology**. v. 130, p. 1063-1072, 2002.

PUNJA, Z. K.; RAHARJO, S. H. T. Response of transgenic cucumber and carrot plants expressing different chitinase enzyme to inoculation with pathogens. **Plant Disease**. v. 80, p. 999-1005, 1996.

PURDY, L. H.; SHMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. **Annual Review of Phytopathology**. v. 34, p. 573-94, 1996.

REGALADO, A. P. et al. The *Lupinus albus* class-III chitinase gene, *IF3*, is constitutively expressed in vegetative organs and developing seeds. **Planta**. v. 210, p. 543-550, 2000.

ROCHA, H. M.; WHEELER, B. E. J. Factors influencing the production of basidiocarps and the deposition and germination of basidiospores of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease on cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Plant Pathology**. v. 34, p. 319-328, 1985.

SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants - their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 11, p. 317-338, 1993.

SALZER, P.; HEBE, G.; HAGER, A. Cleavage of chitinous elicitors from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme* by host chitinases prevents induction of K⁺ and Cl⁻ release, extracellular alkalinisation and H₂O₂ synthesis of *Picea abies* cells. **Planta**. v. 203, p. 470-479, 1997.

SAMBROOCK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, E. F. T. **Molecular cloning – a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor, v. 3, 1989.

SCARPARI, L. M. et al. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosus*. **Journal of Experimental Botany**. p. 1-13, 2004.

SELVAGGINI, S. et al. Independent regulation of chitin synthase activity in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**. v. 150, pp. 921-928, 2004.

SILVA, S. D. V. M.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Crinipellis perniciosus* em cacauzeiros suscetível e resistente à vassoura-de-ruxa. **Fitopatologia brasileira**. v. 24, p. 54-59, 1999.

SILVA, S. D. V. M. et al. Redescrição da sintomatologia causada por *Crinipellis perniciosus* em cacauzeiro. **Agrotropica**. v. 14, p. 1-24, 2002.

SOBERANIS, W. et al. Increased frequency of phytosanitary pod removal in cacao (*Theobroma cacao*) increases yield economically in eastern Peru. **Crop protection**. v. 11, p. 677-685, 1999.

SREENIVASAN, T. N.; DABYDEEN, S. Modes of penetration of young cocoa leaves by *Crinipellis perniciosus*. **Plant Disease**. v. 73, n. 6, p. 478-481, 1989.

ST LEGER, R.; COPPER, R. M.; CHARNLEY, A. I. C. Cuticle degrading enzymes of emtopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. **Journal of General Microbiology**. v. 132, p. 1509-1517, 1986.

STAHEL, G. *Maramius perniciosus* nov. spec. Departament van den Lanbonw in **Suriname Bulletin**. v. 33, p. 1-26, 1915.

TAIRA, T. et al. Antifungal activity of rye (*Secale cereale*) seed chitinases: the different binding manner of class I and class II chitinase to the fungal cell walls. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v 66, n. 5, p. 970-977, 2002.

TAKAYA, N. et al. Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (ChiA) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 62, p. 60-65, 1998a.

TAKAYA, N. et al. Intracellular chitinase gene from *Rhizopus oligosporus*: molecular cloning and characterization. **Microbiology**. v. 144, p. 2647-2654, 1998b.

THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**. v. 24, n. 25, p. 4876-4882, 1997.

THOROLD, C. A. Diseases of cacao. **Clarendon Press**, Oxford, U.K., 1975.

UEDA, M. et al. A novel type of family 19 chitinase from *Aeromonas* sp. No. 10S-24 cloning, sequence, expression, and enzymatic propriety. **Europe Journal of Biochemistry**. v. 270, p. 2513-2520, 2003.

ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F., Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. **Journal of General Microbiology**. v. 137, p. 2163-2169, 1991.

VASSEUR, V., ARIGONI, F., ANDERSEN, H. et al. Isolation and characterization of *Aphanocladium album* chitinase-overproducing mutants. **Journal of General Microbiology**. v. 136, p. 2561-2567, 1990.

WANG, S. et al. Molecular cloning and structural analysis of the gene *Bacillus cereus* exochitinase *Chi36*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 92, n. 1, p. 59-66, 2001.

WATANABE, T. et al. Family 19 chitinase *Streptomyces* species: characterization and disruption. **Microbiology**. v. 145, p. 3353-3363, 1999.

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

WHITE, S. et al. The autolysis of industrial filamentous fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 22, n. 1, p. 1-14, 2002.

WIWAT, C. et al. Cloning, sequencing, and expression of a chitinase from *Bacillus circulans* No. 4.1. **Current microbiology**. v. 44, p. 167-172, 2002.

YANO, S. et al. A chitinase indispensable for formation of protoplast of *Schizophyllum commune* in basidiomycete-lytic enzyme preparation produced by *Bacillus circulans* KA-304. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. n. 68, v. 6, p. 1299-1305, 2004.

ZELLINGER, S. et al. Chitinase gene expression during interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. **Fungi Genetic Biology**. v. 26, p. 131-140, 1999.

ZHONG, R. et al. Mutation of a chitinase-like gene causes ectopic deposition of lignin, aberrant cell shapes, and overproduction of ethylene. **Plant Cell**. v. 14, p. 165-179, 2002.

ZOLAN, M.; PUKKILA, P. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. **Molecular and Cell Biology**. v. 6, p. 195-200, 1986.