

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIA DE MICRORGANISMOS



**Caracterização nutricional e desenvolvimento de marcadores
microssatélites derivados de sequências expressas de
*Microcyclus ulei***

LEANDRO ARAÚJO DE SOUSA

**Ilhéus-BA
Março de 2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Leandro Araújo de Sousa

**Caracterização nutricional e desenvolvimento de marcadores microssatélites
derivados de sequências expressas de *Microcyclops ulei***

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biologia e Biotecnologia
de Microrganismos da Universidade
Estadual de Santa Cruz visando à obtenção
do Título de Mestre em Biologia e
Biotecnologia de Microrganismos.**

**Área de concentração: Diversidade e
Associações Microbianas**

Ilhéus-Bahia-Brasil

Março de 2010

Leandro Araújo de Sousa

Caracterização nutricional e desenvolvimento de marcadores microssatélites derivados
de sequências expressas de *Microcyclus ulei*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos da Universidade Estadual de Santa Cruz visando à obtenção do Título de Mestre em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos.

Área de concentração: Diversidade e Associações Microbianas

Dissertação defendida e aprovada em: 31 de março de 2010

Dra. Karina Peres Gramacho
(CEPLAC)

Dra. Aline Silva
(UESC)

Dr. Dominique Garcia
(UESC/ CIRAD)

Prof^o Dr. Júlio Cezar de Mattos Cascardo
(UESC – Orientador)

O segredo de fazer cada coisa da vida ficar bem feito é o equilíbrio em tudo que fazemos.

*Não devemos ser covardes, nem audaciosos, mas corajosos
Não devemos ser avarentos, nem extravagantes, mas generosos
Não devemos ser geniais nem ignorantes, mas estudiosos.*

Aristóteles (384-322 a.c)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Júlio César de Mattos Cascardo (*in memoriam*) e ao co-orientador, Dr. Dominique Garcia pelos ensinamentos importantes durante o curso e na minha vida profissional;

Ao Dr. Nicolas Carel para o apoio na análise computacional das seqüências ESTs, a Dra. Fernanda Gaiotto para a ajuda na definição dos primers.

A UESC, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado;

A Michelin[®], pelo financiamento deste projeto;

A CAPES, pela concessão de bolsa de estudo;

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos pelos ensinamentos indispensáveis à minha formação;

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pelo apoio constante em todas as etapas deste trabalho e pelos conhecimentos compartilhados;

Aos colegas da pós-graduação e a todos do Laboratório de Biologia Molecular e de Fungos do Centro de Biotecnologia e Genética, pela constante amizade e pelo apoio durante o desenvolvimento desta dissertação, em especial os amigos Samuel, Gileno, Sanderson e amigas Flamélia, Fabiana, Sara, Tatiana e Juliana pela constante ajuda nos trabalhos e companheirismo dedicados a mim durante todo este período.

A toda minha família, em especial meus pais, Afrânio e Elizabeth, à minha irmã Lidiany, o meu irmão Elisson e à minha avó Eunice, pelo amor, incentivo e força que sempre me deram para que conseguisse chegar até o fim;

Aos funcionários da PMB, em especial Carlos Raimundo Reis Mattos e Saulo Cardoso pelo apoio técnico e amizade;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. O fungo <i>Microcyclus ulei</i> (P.Henn) V.Arxa	4
2.1.1. Ciclo de vida	5
2.1.2. Isolamento, cultivo e conservação	7
2.1.3. Epidemiologia	8
2.1.4. Variabilidade patogênica de <i>Microcyclus ulei</i>	10
2.1.5. Estudos sobre variabilidade genética de <i>Microcyclus ulei</i>	13
2.2. Marcadores moleculares	14
2.2.1. Marcadores microssatélites	15
2.3. Transcriptoma em fungos	16
CAPÍTULO – 2 AVALIAÇÃO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO MICELIAL <i>IN VITRO</i> DE <i>Microcyclus ulei</i>	19
RESUMO	20
1. INTRODUÇÃO	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1. O Fungo	22
2.2. Cultivo	22
2.3. Variação dos meios de cultura utilizados para fungos de cultivo lento <i>in vitro</i>	22
2.4. Variação das fontes de carbono	23
2.5. Variação das fontes de nitrogênio	23
2.6. Avaliação dos ensaios	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4. CONCLUSÕES	32

CAPÍTULO - 3 CONSTRUÇÃO E ANOTAÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE ESTs	33
DE MICÉLIO DE <i>Microcyclus ulei</i>	
RESUMO	34
1. INTRODUÇÃO	35
2. MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1. Micélio cultivado <i>in vitro</i>	36
2.2. Extração do RNA	36
2.3. Síntese do cDNA	36
2.4. Fracionamento do cDNA	37
2.5. Ligação	38
2.6. Transforma�o	38
2.7. PCR de colônia	39
2.8. Seqüenciamento dos clones ESTs	39
2.9. Processamento e anota�o das ESTs	40
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4. CONCLUSÕES	47
CAPÍTULO 4: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZA�O DE MARCADORES	48
MICROSSAT�ELITES DERIVADOS DE ESTs DE MICÉLIO DE <i>Microcyclus ulei</i>	
RESUMO	49
1. INTRODU�O	49
2. MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1. Obten�o dos isolados	50
2.2. Extra�o de DNA	51
2.3. Identifica�o das seq�ncias SSR nos ESTs e desenho dos primers	52
2.4. Rea�o de PCR	52
2.5. Resolu�o dos produtos de PCR e análise do polimorfismo	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	65

LISTA DE FIGURAS

	Página
Capítulo 1 Revisão Bibliográfica	
Figura 1: Folha de seringueira com sintomas iniciais do Mal das folhas	5
Figura 2: Ciclo de vida de <i>Microcyclus ulei</i>	6
Figura 3: Micélio de <i>Microcyclus ulei</i> crescendo em meio BSA (MC6)	8
Figura 4: Esquema das diferentes repetições microssatélites encontradas no genoma eucarioto	16
Capítulo 2 Avaliação de Fontes de Carbono e Nitrogênio no Crescimento Micelial <i>in vitro</i> de <i>Microcyclus ulei</i>	
Figura 1: Crescimento da cepa de <i>Microcyclus ulei</i> FTP31 em diferentes meios de cultura	24
Figura 2: Efeito de diferentes meios de cultura no crescimento de colônias de <i>Microcyclus ulei</i>	24
Figura 3: Efeito de concentrações de Glicose, Frutose e Maltose no crescimento de colônias de <i>Microcyclus ulei</i>	26
Figura 4: Efeito da concentração de sacarose no crescimento de colônias de <i>Microcyclus ulei</i>	27
Figura 5: Efeito de diferentes aminoácidos no crescimento de colônias de <i>Microcyclus ulei</i>	29
Figura 6: Efeito de fontes de nitrogênio inorgânico no crescimento de colônias de <i>Microcyclus ulei</i>	31
Capítulo 3 Construção e Anotação de uma Biblioteca de Ests de Micélio de <i>Microcyclus ulei</i>	
Figura 1: Fluxograma do protocolo Creator SMART™ cDNA Library Construction Kit	37
Figura 2: Análise eletroforética do RNA total extraído em gel de agarose	40
Figura 3: Amostra do PCR de colônias evidenciando a inserção dos fragmentos no vetor	41
Figura 4: Perfil eletroforético das frações de cDNA obtidas a partir da eluição do extrato de cDNA na coluna ChromaSpin 1000 (Clontech)	42
Figura 5: Histograma da distribuição percentual de ESTs por <i>contig</i> .	43
Figura 6: Gráficos exibindo o percentual das ESTs nas classes funcionais do GO	45
Capítulo 4 Desenvolvimento e Caracterização de Marcadores Microssatélites Derivados de Ests de Micélio de <i>Microcyclus ulei</i>	
Figura 1: Classes de SSR encontrada na biblioteca de cDNA de <i>Microcyclus ulei</i> .	54
Figura 2: Perfil eletroforético dos produtos amplificados com o par de primers microssatélites Mu-SSR7	57

Figura 3.	Perfil eletroforético dos produtos amplificados com o par de primers microssatélites Mu-SSR8	57
Figura 4:	Perfil eletroforético dos produtos amplificados com o par de primers microssatélites Mu-SSR9	58

LISTA DE TABELAS

		Página
Capítulo 1	Revisão Bibliográfica	
Tabela 1:	Escala de notas para a classificação do tipo de reação dos clones de <i>Hevea</i>	11
Capítulo 3	Construção e Anotação de uma Biblioteca de Ests de Micélio de <i>Microcyclus ulei</i>	
Tabela 1:	Número de sequências ESTs da biblioteca de cDNA de micélio de <i>Microcyclus ulei</i> .	42
Tabela 2:	Lista dos ESTs de micélio de <i>Microcyclus ulei</i> com homologia de sequência.	45
Capítulo 4	Desenvolvimento e Caracterização de Marcadores Microssatélites Derivados de Ests de Micélio de <i>Microcyclus ulei</i>	
Tabela 1:	Localização geográfica e origem dos isolados de <i>Microcyclus ulei</i> utilizados na caracterização dos microssatélites	51
Tabela 2:	Sequências dos iniciadores, condições de PCR e polimorfismo observado para 12 locos em <i>Microcyclus ulei</i> .	56

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta de Busca Básica de Alinhamento Local)

BSA - batata sacarose Agar

BOD - *biochemical oxygen demand*

Cap3 - *Sequence Assembly Program* (Programa de Conjuntos de Sequências)

ESTs - seqüências de etiquetas expressas

GO - *Gene Ontology*

GOCat - *Gene Ontology Categorizer*

IPTG - isopropylthio- β -D-galactoside

Meio - meio Luria-Bertani

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PDA - *potato dextrose Agar*

PMB - Plantações Michelin da Bahia

RAPDs - *Random Amplified Polymorphism DNA*

RFLPs - *Restriction Fragment length Polymorphism*

SALB - *South American leaf blight*

SSR - *Simple Sequence Repeats*

SSRIT - *Simple Sequence Repeat Identification tool*

X-GAL - 5-bromo-4-choro-3-indolyl- β -D-galactoside

RESUMO

SOUSA, Leandro Araújo, Lic., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, março de 2010. **CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES DERIVADOS DE SEQUÊNCIAS EXPRESSAS DE *Microcyclus ulei***. Orientador: Júlio César de Mattos Cascardo. Co-orientador: Dominique Garcia.

O ascomiceto *Microcyclus ulei* é um parasita obrigatório, agente causal do Mal das folhas (SALB, South American leaf blight), uma das mais destrutivas doenças da seringueira na América Latina. O ataque do fungo causa a queda prematura e repetida dos folíolos novos que pode levar à morte da árvore. A disseminação da doença é via esporos por meio de vento e chuva. A forma de controle mais efetiva é o uso de cultivares resistentes obtidas por melhoramento genético. Sabe-se que o *M. ulei* possui alta variabilidade patogênica, no entanto, existem poucas informações sobre sua diversidade genética. Para se caracterizar a patogenicidade das populações de isolados de *M. ulei*, são necessárias inoculações dos conídios nas folhas de uma gama de cultivares de *Hevea* com diferentes níveis de resistência. Devido o fungo ser um parasita obrigatório, ele possui um crescimento *in vitro* extremamente lento, limitando o desenvolvimento de pesquisas sobre a biologia e fisiologia do mesmo. A utilização de ferramentas moleculares como bibliotecas de cDNA pode auxiliar na compreensão de vias metabólicas e processos biológicos do fungo. Diante do exposto, este trabalho objetivou melhorar o crescimento micelial *in vitro* testando diferentes meios de cultura, construir uma biblioteca de sequências de genes expressos (ESTs) do micélio de *Microcyclus ulei* e desenvolver novos marcadores microsatélites a partir dos ESTs identificados. No ensaio nutricional avaliaram-se diferentes meios de cultura, fontes de carbono e de nitrogênio orgânico e inorgânico. Dentre todos os meios de cultura testados, o meio BSA revelou-se o mais favorável para o crescimento micelial. O Meio BSA modificado com cisteína (1mM), favoreceu o crescimento radial das colônias relacionado com um maior crescimento das hifas. Objetivando a obtenção de SSR em sequências expressas, uma biblioteca *full-length* de cDNA foi construída a partir do micélio do fungo cultivado em meio BSA. Do RNA extraído do micélio foi produzido uma biblioteca de 1920 clones de cDNA. Destes, 1712 foram sequenciados. Após a limpeza das extremidades das sequências, um total de 585 ESTs de qualidade (PHRED 10 e

tamanho superior a 90 pb) foram gerados. Após o agrupamento pelo programa CAP3, 54 contigs e 356 singlets foram obtidos. A análise com o Blast X das sequências disponíveis nos banco de dados WhiteHeadFungalProt and Pfam permitiram anotar 56 ESTs (13.5%) com prováveis funções biológicas; 43 ESTs (10.5%) tiveram homologia com seqüências sem função identificada e 311 ESTs (76 %) não tiveram homologia. Dentro das seqüências *unigen* foram encontrados 5447 SSR: 3324 (61%) são motivos dinucleotídios, 1541 (28%) motivos trinucleotídios, 400 (7,5%) motivos tetranucleotídios e 106 (3,5%) SSRs para o restante penta até decanucleotídios encontrados. Dos 12 pares de primers definidos a partir das ESTs, 6 amplificaram e apenas um mostrou locos polimorfos em 23 isolados coletados nos estados da Bahia (Igrapiúna, Una, Porto Seguro), Espírito Santo, Mato Grosso e Amazônia.

Palavras chaves: Mal das folhas; *Microcyclus ulei*; *Hevea*; marcadores ESTs-SSR; diversidade genética.

ABSTRACT

SOUSA, Leandro Araújo, Lic., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, march 2010.

NUTRITIONAL CHARACTERIZATION AND DEVELOPMENT OF DERIVATIVES MICROSATELLITE MARKERS EXPRESSED SEQUENCE of *Microcyclus ulei*.

Advisor: Júlio César de Mattos Cascardo. Advisor-commite: Dominique Garcia.

The ascomycota, *Microcyclus ulei*, is an obligate parasite, causal agent of the South American leaf blight (SALB), one of the most destructive diseases of the rubber tree in Latin America. The attack of this fungus causes the premature and repeated fall of the young leaflets that can induce the death of the tree. The disease is spread via spores by wind and rain and most effective form of control is the use of resistant cultivars that are obtained through breeding program. It is known that *M. ulei* has high pathogenic variability, however, little information is available about their genetic diversity. To characterize the populations of pathogenic isolates of *M. ulei*, inoculations are necessary for conidia on the leaves of a range of *Hevea* cultivars with different resistance levels. Due to fungus is an obligate parasite, it has an extremely slow growth *in vitro*, thereby limiting the development of research on its biology and physiology. The use of molecular tools such as cDNA libraries can assist in the understanding of pathways and biological processes of the fungus. Given the above, this study aimed to improve the mycelial growth *in vitro* testing different culture media, build a library of genes expressed sequences (ESTs) from the mycelium of *Microcyclus ulei* and develop new microsatellite markers from ESTs identified. In the nutritional study, we evaluated different nutritional media, carbon sources and organic and inorganic nitrogen. Among all media tested, medium BSA proved to be the most favorable for mycelial growth. The Medium BSA modified with cysteine (1mM), favored the radial growth of colonies associated with increased growth of hyphae. Aiming to obtain SSR in expressed sequences, a library full-length cDNA was constructed from the mycelium of the fungus cultivated in BSA. RNA was extracted from the mycelium produced a library of 1920 cDNA clones, 1712 of these were sequenced. After cleaning the ends of the sequences, a total of 585 ESTs quality (PHRED 10 and larger than 90 bp) were generated. After grouping the program Cap3, 54 singlets and 356 contigs were obtained. The analysis with the Blast X sequences available in the database WhiteHeadFungalProt and Pfam allowed note 56 ESTs (13.5%)

with probable biological functions; 43 ESTs (10.5%) had no homology with sequences identified function and 311 ESTs (76%) did not had homology. Within the sequences were found Unigen SSR 5447: 3324 (61%) dinucleotides, 1541 (28%) trinucleotides, 400 (7.5%) tetranucleotides and 106 (3.5%) for the remaining SSRs penta to decanucleotides. Of the 12 primer pairs defined from the EST sequences, 6 primer pairs gave amplication product and only one displayed a polymorphic loci in 23 isolates collected in the states of Bahia (Igrapiúna, Una, Porto Seguro), Espírito Santo, Mato Grosso and the Amazon.

Key-words: South American Leaf Blight; *Microcyclus ulei*; *Hevea*; ESTs-SSR marker; genetic diversity.

1. INTRODUÇÃO

O Mal das folhas da seringueira, também conhecido como (*South American leaf blight*, SALB) é uma doença causada pelo fungo *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx. O fungo infecta os folíolos jovens, induzindo uma gama de sintomas, os quais dependem, sobretudo, da idade dos folíolos e da suscetibilidade do hospedeiro. Essa doença, até o momento restringe-se ao continente latino-americano, onde limita o desenvolvimento da heveicultura e causa grandes perdas na produção de látex. (GASPAROTTO *et al.*, 1997)

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex. ADR. de Juss) Muell.-Arg.] é uma espécie arbórea nativa da região amazônica e compreende a maior fonte produtora de borracha natural do mundo. Ocorre preferencialmente em solos argilosos e férteis da beira de rios e várzeas. Esta planta pertence ao gênero *Hevea*, família Euphorbiaceae e, atualmente, são conhecidas onze espécies: *Hevea brasiliensis*; *Hevea guianensis*; *Hevea benthamiana*; *Hevea nitida*; *Hevea rigidifolia*; *Hevea camporum*; *Hevea sipruceana*; *Hevea microphylla*; *Hevea camargoana*; *Hevea paludosa*; *Hevea pauciflora* (GONÇALVES, *et al.*, 1983).

No Brasil, seringais ocorrem principalmente nas regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste até o norte do Paraná. No Nordeste, além da Bahia existem cultivos em exploração no Estado de Pernambuco. Na região Sul, devido às condições climáticas desfavoráveis, a seringueira não é cultivada (GASPAROTTO *et al.*, 1997). Muitas regiões do Brasil têm condições climáticas favoráveis ao crescimento da seringueira e a produção de látex, porém tais condições são também propícias a surtos epidêmicos severos do Mal-das-folhas.

A exploração de seringais no Brasil teve seu apogeu entre 1880 e 1910, onde a borracha tinha importante papel na economia nacional, constituindo o segundo produto na pauta de exportações brasileiras (GASPAROTTO *et al.*, 1997). Hoje, com a produção nacional de borracha natural em baixa, o Brasil passou a ser importador dessa matéria-prima e os países Asiáticos, principalmente Tailândia, Indonésia e Malásia, são os principais produtores, detendo cerca de 90% da produção mundial (PEREIRA, 2002). No entanto, essa produção é realizada a partir de cultivares susceptíveis ao Mal das folhas, tornando essa doença uma ameaça para esses países. Diante disto, o Mal das folhas é reconhecida por muitos fitopatologistas como a enfermidade mais grave desta cultura (FURTADO e TRINDADE, 2005).

A demanda por borracha no país supera em muito a oferta, pois só em 2004 foram consumidas, 282.000 toneladas, enquanto a produção ficou em torno de 98.000. Devido a esse fato, grande parte da borracha consumida no país é importada (AGRIANUAL, 2006).

Os estudos sobre a biologia e fisiologia do *M. ulei* são poucos e um dos fatores limitante é o seu crescimento *in vitro* bastante lento, necessitando assim de estudos nutricionais mais aprofundados. As pesquisas realizadas sobre a biologia do *M. ulei* foram relacionadas ao isolamento, cultivo *in vitro*, morfologia, fisiologia, epidemiologia e variabilidade patológica, mas pouco se conhece a respeito da diversidade genética do fungo que é de grande importância para um melhor entendimento da estrutura das populações desse fitopatógeno. O conhecimento dessa diversidade pode auxiliar também na escolha dos genótipos de seringueira a serem plantados em determinada região.

Para responder tais questões foi utilizado neste trabalho, técnicas de microbiologia clássicas para o cultivo *in vitro* do fungo e ferramentas de biologia molecular para a construção de uma biblioteca de genes expressos e desenvolvimento de marcadores microssatélites derivados de ESTs.

Os marcadores SSR-EST são uma eficiente ferramenta para elucidar questões relacionadas à genética de populações, como análises de fluxo gênico e estimar a relação de parentesco entre os indivíduos, gerando assim dados sobre a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações naturais, que são essenciais para a compreensão da diversidade genética (MEDEIROS *et al.*, 2006).

Dentro deste contexto, esse trabalho objetivou o melhoramento do meio de cultura de forma a produzir rapidamente micélio novo, construção de uma biblioteca de cDNA de micélio e desenvolvimento de marcadores microssatélites derivados de ESTs para auxiliar estudos de diversidade genética do fungo.

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Microcyclus ulei* (P.Henn) V.Arx

O *Microcyclus ulei* é um fungo fitopatígeno, agente causal da SALB (*South American Leaf Blight*) ou Mal das folhas, doença responsável pelo baixo desenvolvimento da heveicultura no Brasil e considerada o principal problema fitopatológico para a heveicultura na América Latina. Foi descrito primeiramente por Ule em árvores silvestres de *Hevea* spp. em 1900 no Brasil, coletando amostras próximo ao rio Juruá, região Amazônica, e em 1902 no Peru (LIEBEREI, 2007).

O *M. ulei* é um fungo biotrófico especializado que ataca plantas do gênero *Hevea* e dentro deste, as espécies *Hevea brasiliensis*, *Hevea guinensis*, *Hevea benthamiana*, *Hevea spruceana*, *Hevea camargaona*, *Hevea camporum* e seus híbridos (JUNQUEIRA *et al.*, 1989). Pertence ao filo Ascomycota, classe Ascomycete, ordem Micosphaerellales, família Mycosphaerellaceae, (ROMERO, *et al.*, 2006). Endêmico das Américas do Sul e Central, o fungo ocorre desde a latitude 18°N em El Palmar, no México até a latitude de 24°S, no Estado de São Paulo (GASPAROTTO *et al.*, 1997). No Brasil, o fungo está distribuído em todos os estados onde a seringueira é cultivada.

O fungo ataca folhas jovens (Figura 1) causando lesões levemente escurecidas que provocam deformações, enrugamentos nos limbos e queda prematura das mesmas e, em condições ambientais favoráveis, pode ocorrer o desfolhamento total das árvores. Essas lesões, especialmente nas superfícies abaxiais, apresentam tonalidades de aspecto cinza-esverdeado-feltroso resultantes da esporulação conidial da primeira fase assexuada do *M. ulei*. Folíolos maduros não são infectados pelo fitopatígeno. Em seringais adultos susceptíveis, ataques sucessivos causam a morte-descendente dos ramos e até das plantas, ou facilitam a incidência de outras doenças que também podem determinar a mortalidade (GASPAROTTO *et al.*, 1997).

O clima influencia consideravelmente o desenvolvimento da doença, a duração dos períodos de molhamento foliar e de temperaturas iguais ou superiores a 20 °C são fatores climáticos que determinam a ocorrência do Mal das folhas (GASPAROTTO *et al.*, 1991).

Existem vários métodos de controle para o Mal das folhas: enxertia de copa, controle químico, plantio em área de escape, controle biológico, dentre outros. No

entanto, o controle genético através da utilização de clones resistentes é a medida de controle mais eficiente (GARCIA *et al.*, 1995).



Figura 1. Folha de seringueira com sintomas iniciais do Mal das folhas.

2.1.1. Ciclo de vida

O fungo *M. ulei* possui ciclo biológico completo na seringueira, apresentando três fases distintas no seu ciclo de vida e dois tipos de esporos infectivos, conforme o tipo de reprodução (Figura 2): conidiósporos (reprodução assexuada), cujo ciclo de vida varia de 6 a 10 dias, dependendo da variedade; e ascósporos (reprodução sexuada), com ciclo de vida de 100 a 150 dias (CHEE e HOLIDAY, 1986). Baseado nestas estruturas reprodutivas o fungo é conhecido por vários nomes. A fase telomórfica do fungo é *Microcyclus ulei* (Henn.) von Arx ; a fase anamórfica-conidial (primeira fase assexuada) é denominada *Fusicladium macrosporum* Kuyper 1912 e o estágio picnidial (segunda fase assexuada) é *Aposphaeria ulei* Henn. (CHEE E HOLLIDAY, 1986).

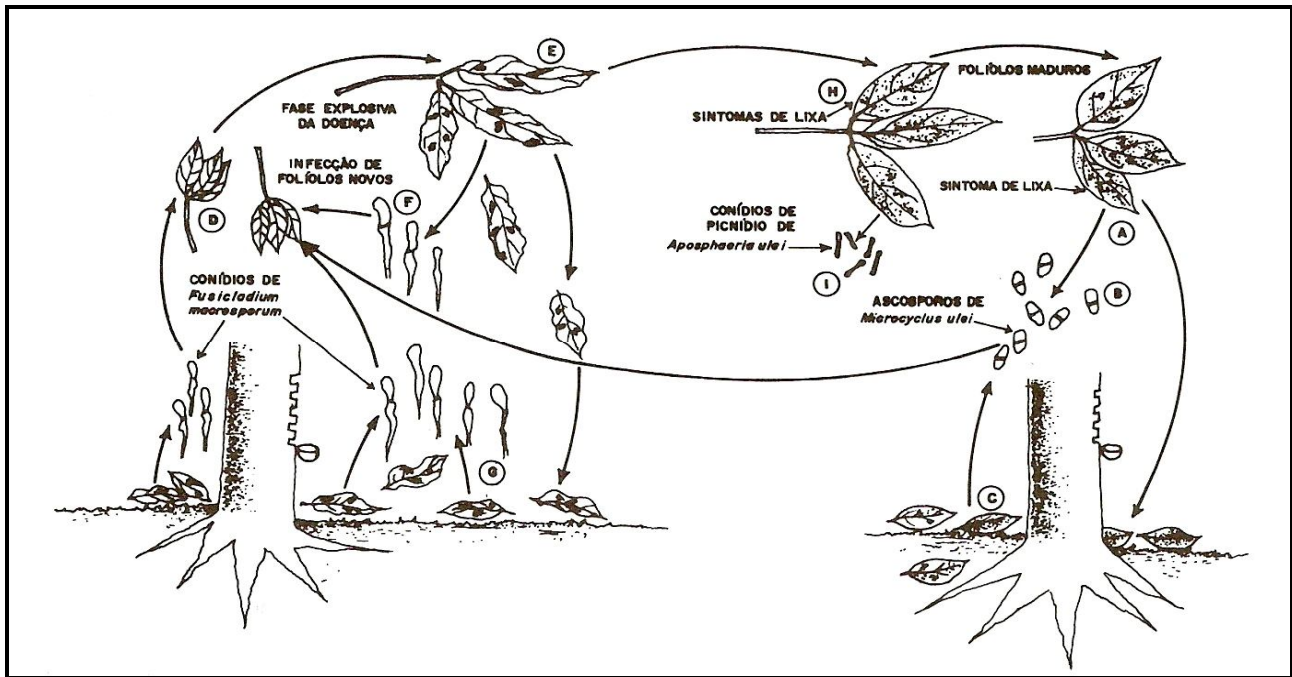


Figura 2. Ciclo de vida de *M. ulei* (Chee e Holliday, 1986)

Os ascósporos presentes nas folhas velhas representam a primeira fonte de infecção (inóculo primário) quando as condições climáticas voltam a ser favoráveis. Em contato com os folíolos novos, os ascósporos absorvem umidade da chuva ou orvalho, germinam e produzem tubos germinativos. Estes produzem apressórios, a partir dos quais hifas infectivas se desenvolvem, penetram diretamente e propagam-se de forma intercelular através dos parênquimas colonizando os tecidos rapidamente (LIBEREI, 2007). Sob condições favoráveis à doença, cerca de seis dias depois, os folíolos infectados exibem lesões levemente escurecidas de aspecto cinza-esverdeado-fetoso resultantes da esporulação conidial da primeira fase assexuada do fungo. Essas lesões provocam deformações e enrugamentos nos limbos, especialmente nas superfícies abaxiais (GASPAROTTO *et al.*, 1984).

Normalmente os folíolos infectados caem precocemente quando os ataques ocorrem de forma mais severa. Desses folíolos caídos ou de folíolos lesionados ainda presos aos pecíolos, conídios são disseminados pelo vento ou chuva e infectam outros folíolos novos da mesma planta ou de plantas adjacentes. Cerca de 20 a 30 dias mais tarde, são observados nos folíolos estromas negros (sintomas de lixa) que abrigam a segunda fase assexuada ou anamórfica-picnidial do fitopatógeno (Holliday (1970). Ainda segundo Holliday (1970), os picnídios de *M. ulei* germinam, mas não causam infecções, não tendo com isso, importância na disseminação do fitopatógeno. Na literatura, não

existe informações concretas sobre a verdadeira função dessa segunda fase anamórfica do fungo. Mais um mês depois, os sintomas tardios de lixa revelam algumas cavidades estromáticas que protegem os ascos, que após o amadurecimento, cerca de mais um mês, liberam os ascósporos para reinfestar folhas novas dando continuidade ao ciclo biológico do fitopatógeno. Portanto, a duração total do ciclo de vida do fitopatógeno compreende um período de quatro a cinco meses (JUNQUEIRA *et al.*, 1986).

A presença da fase sexuada aumenta a possibilidade de combinação gênica, além de mutações ocasionais. Esse fato pode explicar a alta variabilidade de raças (ou grupos patogênicos) observada nesse fitopatógeno em todas as regiões onde se cultiva seringueira (MATTOS *et al.*, 2003).

2.1.2. Isolamento, cultivo e conservação

O isolamento do *M. ulei* em meio de cultura é realizado de forma direta, a partir de conídios retirados de folhas que apresentam esporulação. Segundo Gasparotto (1997), o isolamento deve ser feito com folíolos novos, recém-coletados, com lesões bem esporuladas e secas (isentas de água de chuva, orvalho ou umidade proveniente de câmara úmida). Com o auxílio de estilete de ponta fina estéril, os conídios são transferidos das lesões das superfícies abaxiais dos folíolos para o meio BSA, contido em placa de Petri ou tubo de ensaio. A germinação dos conídios se inicia depois de três horas de incubação à 24°C. Após esse período observa-se um rápido crescimento do tubo germinativo e dentro das 24 horas seguintes as primeiras ramificações da hifa primária (GASPAROTTO *et al.*, 1984). A viabilidade dos esporos sendo curta é conveniente realizar o isolamento do fungo a partir de lesões foliares recentes (JUNQUEIRA *et al.*, 1984).

Em meio de cultura, o micélio do fungo pode produzir conídios, porém, alguns isolados não desenvolvem essas estruturas nessa condição e são ditos “não esporulantes” (JUNQUEIRA *et al.*, 1984). De acordo com Junqueira e colaboradores, (1986) para a produção de conídios *in vitro* deve-se utilizar um meio de cultura adequado, idade da cultura inferior a duas semanas, luminosidade diária com regime de luz alternada de ciclos de uma hora de luz e três horas de escuro e evitar repicagens sucessivas, pois isso afeta drasticamente a produção de conídio. Em um estudo de melhoramento do meio de cultura visando aumentar à esporulação *in vitro*, os melhores

resultados foram conseguidos por Mattos, (1999) adicionando água de coco verde no meio BSA. Além de macronutrientes, a água de coco possui muitos micronutrientes minerais e elementos inorgânicos como: Na, K, P, Ca, Mg, Cu, Zn, Mn e Fe. Essa rica composição de nutrientes favorece a produção de esporos do fungo (GARCIA e JESUS, 2007).

As colônias de *M. ulei* em meio de cultura são globosas, cinza-esverdeadas, com aspecto micelial feltroso. Após algum tempo aproximadamente dois meses é comum observar a formação de um estroma negro ausente de micélio fértil, (Figura 3) que cresce lentamente sob a superfície do meio de cultura (JUNQUEIRA *et al.*, 1984). *M. ulei* tem crescimento vegetativo vagaroso em BSA e em inúmeros outros meios de cultura já testados para esse fungo, inclusive com variações de pH, temperatura e regime luminoso.

Um dos primeiros trabalhos sobre o cultivo *in vitro* do fungo foi realizado por Chee, (1978) e posteriormente por outros autores como Lieberei, *et al.*, (1983), Junqueira, *et al.*, (1984), Mattos, (1999) entre outros, os quais têm melhorado as metodologias de manejo *in vitro* do fungo proposta inicialmente por Chee, (1978).



Figura 3. Micélio de *M. ulei* crescendo em meio BSA (MC6) proposto por Junqueira *et al.* (1984) (Fonte: Sousa, L.A., *et al* 2010).

2.1.3. Epidemiologia

O território brasileiro possui clima tropical, porém a umidade, a temperatura e o regime pluviométrico diferem entre as regiões. A interação desses elementos da natureza, junto com o relevo, determina a condição climática dos ecossistemas terrestres. Essas variáveis meteorológicas são pontos críticos para que ocorram as fases do ciclo epidemiológico de muitos fitopatógenos.

Os fatores climáticos principais para que ocorra infecção do *M. ulei* na folha da seringueira, são: duração do período de molhamento foliar, temperatura e umidade.

Conforme Gasparotto *et al.*, (1989), em condições controladas em Viçosa, MG, Brasil, verificaram que para haver infecções conidiais de *M. ulei*, foram necessárias pelo menos seis horas de molhamento foliar a 24 °C, e de oito horas a 20 e 28 °C, enquanto a 16 °C não houve manifestações dos sintomas da doença. A melhor combinação temperatura-tempo de molhamento foliar para ocorrência de infecções foi a 24 °C com pelo menos 16 horas de molhamento foliar. No campo, os mesmos autores verificaram que, em Ponte Nova, MG, a severidade da doença não foi significativamente correlacionada com o total de precipitação pluvial, nem com as temperaturas máxima e média; porém, positivamente correlacionada com o período de molhamento foliar, a umidade relativa do ar maior ou igual a 90% e a temperatura mínima, e negativamente correlacionada com períodos de temperatura menor ou igual a 20 °C.

Os conídios de *M. ulei* são disseminados por água de chuva e ventos, sendo este último, o maior responsável pela disseminação, não somente dentro de uma mesma plantação, como também a longas distâncias (CHEE, 1976). Esses esporos encontram condições propícias para germinação e infecção de folíolos quando há um período de 8 a 10 horas consecutivas de molhamento foliar. Longo período diário seco reduz a infectividade de conídios e a incidência da doença (LANGFORD, 1945).

Os ascósporos, que se encontram protegidos nas cavidades estromáticas, são os responsáveis pela sobrevivência do fitopatógeno quando as condições de vida lhes são adversas (carência ou ausência de tecidos suscetíveis no hospedeiro, temperaturas e umidades mais baixas). Esses ascósporos são ejetados dos ascostromas, quando as folhas são molhadas e submetidas a temperaturas mais baixas, como 13 a 15 °C (CHEE, 1976).

Além dos fatores ambientais favoráveis a disseminação do fitopatógeno, existem outros que devem ser considerados. Por exemplo, até 12 e 15 dias de idade as folhas de seringueira são suscetíveis (dependendo do clone da planta). Outro fator importante é que a partir do terceiro ou quarto ano a seringueira perde todas as folhas e reenfolha anualmente (GASPAROTTO, *et al.*, 1991). Estas características devem ser consideradas para a aplicação de técnicas adequadas no controle do Mal das folhas.

2.1.4 Variabilidade patogênica de *Microcyclus ulei*

Ao longo dos estudos sobre a infectabilidade e biologia do *M. ulei* a caracterização da virulência é um aspecto essencial para poder diferenciar linhagens do fungo e selecionar genótipos resistentes de seringueira.

Raças patogênicas são fitopatógenos da mesma espécie com morfologia similar ou idêntica, mas com diferentes níveis de virulência. O primeiro trabalho sobre a caracterização de raças patogênicas de *M. ulei*, foi realizado por LANGFORD (1945).

A identificação de raças patogênicas de *M. ulei* é baseada em reações distintas dos isolados em uma série de cultivares diferenciadores, os quais apresentam um ou vários genes de resistência distintos a uma ou mais raças (JUNQUEIRA *et al.*, 1986). Após a inoculação e o desenvolvimento da doença a planta hospedeira apresenta vários sintomas nos folíolos e os principais critérios observados são: o período de incubação, o período latente, o tamanho das lesões, a quantidade de esporos formados (intensidade da esporulação), a distribuição da camada conidial na lesão, a quantidade e o tempo para formação do estroma (fase sexual) (JUNQUEIRA *et al.*, 1988; 1990; RIVANO, 1997). Geralmente, a intensidade de esporulação é o critério avaliado para definir a virulência dos isolados. Para definir o nível de resistência (de altamente resistente até altamente susceptível) dos clones de *Hevea* à infecção pelo *M. ulei*, (CHEE e DARMONO 1986; JUNQUEIRA *et al.*, 1986; HASHIM e ALMEIDA, 1987, MATOS *et al.*, 2003) adotaram uma escala de notas de acordo com critérios estabelecidos. A Tabela 1 apresenta os critérios avaliados pelos diferentes autores.

Tabela 1. Escala de notas para a classificação do tipo de reação dos clones de *Hevea*.

Nota	Autores [MI]		Darmono & Chee (1985) [Discos foliares]		Hashim & Almeida (1987) [Folhas <i>in planta</i>]		Junqueira <i>et al.</i> (1986) [Folhas <i>in planta</i>]			Matos <i>et al.</i> (2003) [Folhas <i>in plantas</i>]	
	DL (μ m)	NR	TR	NR	DL (mm)	TR	NR	TR	NR		
0	Sem sintomas	Altamente resistente	Sem sintomas	Altamente resistente	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
1	0 - 250	Altamente resistente	Manchas cloróticas, sem necrose e sem esporulação	Resistente	≤ 1	Pontos necróticos	Resistente	Lesões necróticas sem esporos;	Resistente		
2	251 - 350	Resistente	Clorose e necrose com muito pouca esporulação	Resistente	≤ 1	Pontos necróticos	Resistente	Lesões não necróticas sem esporos	Resistente		
3	352 - 450	Moderadamente resistente	Necrose com pouca a média esporulação	Moderadamente resistente	1 - 2	Lesões com centro necrótico sem esporos	Resistente	Esporulação muito fraca sobre a face inferior da lesão	Moderadamente resistente		
4	451 - 550	Susceptível	Necrose com média a alta esporulação	Susceptível	> 2	Lesões necróticas sem esporos	Resistente	Esporulação forte cobrindo parcialmente a face inferior da lesão	Moderadamente resistente		
5	551	Altamente susceptível	Necrose com esporulação muito forte	Altamente susceptível		Lesões não necróticas sem esporos	Resistente	Esporulação muito forte cobrindo toda a face inferior da lesão	Susceptível		
6	-----	-----	-----	-----	≤ 2	Lesões com esporos nas bordas	Moderadamente resistente	Esporulação muito forte cobrindo toda a face inferior da lesão e forte na face superior.	Altamente susceptível		
7	-----	-----	-----	-----	> 2	Lesões com esporos nas bordas	Moderadamente resistente	-----	-----		
8	-----	-----	-----	-----	≤ 2	Lesões parcialmente esporuladas	Moderadamente resistente	-----	-----		
9	-----	-----	-----	-----	> 2	Lesões parcialmente esporuladas	Moderadamente resistente	-----	-----		
10	-----	-----	-----	-----	$\leq 1,5$	Lesões com esporulação abundante na face abaxial	Susceptível	-----	-----		
11	-----	-----	-----	-----	1,5 - 2,5	Lesões com esporulação abundante na face abaxial	Susceptível	-----	-----		
12	-----	-----	-----	-----	1,5 - 2,5	Esporulação abundante na face abaxial	Susceptível	-----	-----		
13	-----	-----	-----	-----	$> 2,5$ mm	Esporulação abundante na face abaxial	Susceptível	-----	-----		
14	-----	-----	-----	-----	2-2,5 mm	Esporulação abundante na face abaxial e na face adaxial	Altamente susceptível	-----	-----		

MI= método de inoculação; DL= diâmetro da lesão; TR; tipo de reação; NR= Nível de resistência.

As primeiras comparações entre virulências de isolados de *M. ulei* foram relatadas na América Central, com isolados coletados na Guatemala e Costa Rica (LANGFORD, 1945). Posteriormente esta observação foi confirmada por Langdon (1965), ao testar um isolado proveniente de cada país, em descendentes do clone F4542 (*Hevea benthamiana*) mostrando que o isolado da Costa Rica infectava e esporulava abundantemente neste clones, sendo denominado raça 2, ao contrario do isolado do Guatemala que esporulava somente no clone IAN 717 e foi designado raça 1.

Miller (1966) identificou duas novas raças designadas raça 3 e raça 4. A raça 3, constituída de isolados proveniente do Guatemala e Costa Rica, não atacava progênies de Madre de Dios, Peru; porém atacava progênies do clone F4542. A raça 4, proveniente de Belém atacava um clone primário, F409 e parentes do IAN710 e IAN713, mas não atacava progênies do clone F4542.

Dos amplos trabalhos de Junqueira *et al.*, (1986; 1989) utilizando diferentes espécies de seringueira e grandes números de isolados, os autores determinaram quatro grupos distintos de acordo com a esporulação dos isolados:

- **Grupo I:** isolados que esporulam em todos os clones com genes de *H. brasiliensis* pura;
- **Grupo II:** isolados que esporulam em todas as progênies ou na maioria dos clones de *H. brasiliensis* e em alguns híbridos de *H. benthamiana*, como IAN6323 e IAN6158;
- **Grupo III:** isolados que esporulam tanto na maioria dos clones de híbridos de *H. benthamiana*, como na maioria dos clones de *H. brasiliensis*, exceto Fx 985 e MDF180
- **Grupo IV:** isolados que esporulam somente em clones de *H. camporum* e seus prováveis derivados, como CNS-AM 7665 e CNS-AM 7718.

Com os trabalhos de Hashim e Almeida (1987), duas raças denominadas 5 e 6 (pertencendo aos grupos I e II, descrito por Junqueira, 1986; 1989) foram identificadas a partir de isolados provenientes respectivamente do Pará e da Bahia.

Chee et al. (1986) trabalhando com discos de folhas, descreveram novas raças como 7, 8 e 9 e propuseram os clones IAN710, IAN 717 e Fx2261, Fx985, Fx2804 e Fx25 como série clonal para identificação dessas oito raças.

Rivano (1997), trabalhando com isolados coletados na Guiana Francesa, detectou que a maioria dos isolados pertencem ao grupo II definido por Junqueira (1986; 1989).

Em estudos feitos nas Plantações Michelin da Bahia (MATTOS *et al.*, 2003) utilizando metodologias similares realizadas nos estudos anteriormente mencionados, identificaram 36 padrões de virulência entre os 50 isolados testados, permitindo supor que encontraram novas raças do fungo. De acordo com Lieberei, (2007) um total de 68 raças com diferentes espectros de reação no hospedeiro tem sido agora identificado. A grande diversidade do poder patogênico desse parasita mostra a sua elevada capacidade de adaptação e a dificuldade para se obter, no futuro, clones com resistência durável (MATTOS *et al.*, 2003).

2.1.5. Estudos sobre variabilidade genética de *Microcyclus ulei*

Por muitos anos, a única maneira de caracterizar isolados de *M. ulei* de diferentes regiões geográficas era através da inoculação, em uma gama de clones de *Hevea* diferenciadores. Poucos são os estudos realizados diretamente sobre o genoma do fungo para identificar genótipos diferentes, no entanto, a variabilidade genética do *M. ulei* tem sido evidenciada com o uso de alguns marcadores moleculares como isoenzimas e, mas recentemente com marcadores microssatélites (ROMERO, *et al.*, 2006).

Em um estudo realizado por Junqueira *et al.* (1987), avaliaram sete isolados de *M. ulei* com diferentes níveis de virulência provenientes de 4 estados diferentes aplicando nove isoenzimas. Os resultados conseguidos permitiram comprovar que os isolados que diferiram na virulência, também tiveram diferenças nos padrões isoenzimáticos obtidos, ou seja, pode se estabelecer relação entre os padrões isoenzimáticos dos isolados e seu grau de virulência, esta diferença pode estar relacionada à especificidade de hospedeiros e capacidade de esporulação. Os padrões de isoperoxidases, isoesterases e isolactato desidrogenases puderam diferenciar um maior número de isolados.

A detecção de microssatélites específicos para *M. ulei* a partir de uma biblioteca enriquecida para sequências repetidas de CA e GA, permitiram o desenho de onze pares de primers (LEGUEN, *et al.*, 2006). Estes foram avaliados em onze isolados de *M. ulei*. Os resultados mostraram que nove locos apresentaram polimorfismo entre os isolados provenientes de diferentes regiões do Brasil e cinco entre os isolados provenientes da Guiana Francesa. O locus que apresentou maior polimorfismo entre todos os isolados foi o Mu5. Esse trabalho produziu os primeiros marcadores moleculares para o *M. ulei*, auxiliando assim no entendimento sobre a estrutura genética das populações deste fitopatógeno.

2.2. Marcadores moleculares

A introdução de técnicas de biologia molecular ofereceu uma nova dimensão na genética de populações de fungos filamentosos. Antes do advento dos marcadores moleculares, a caracterização de isolados fúngicos era restrita, principalmente, a de marcadores morfológicos. A caracterização morfológica, embora útil, é bastante limitada devido ao baixo número de caracteres passíveis de serem analisados (BRIDGE e ARORA, 1998)

Marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente, podem ser usados para várias finalidades como: avaliar níveis de diversidade genética e relações filogenéticas intra e inter específicas e identificar raças e patótipos (LEAL-BERTIOLI, 1998). Além disso, os marcadores de DNA têm aplicação direta em estudos de mapeamento genético, análise de similaridade e distância genética.

Diversas técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para a detecção de variabilidade genética ao nível de sequência de DNA. Estas técnicas permitem a obtenção de um número abrangente de marcadores moleculares, cobrindo todo o genoma do organismo (SANTOS, *et al.*, 2005). Os diversos tipos de marcadores hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade ao nível de DNA, e assim mudam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade.

Atualmente os principais marcadores disponíveis para a detecção de variabilidade genética são: RFLP (*Restriction Fragment length Polymorphism*); minisatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*); RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*); STS (*Sequence Tagged Sites*); Microsatélite (*SSR – Single Sequence Repeats*) e AFLP (*Amplified Fragment Length polymorphism*) (BORÉM e CAIXETA, 2009).

A produção de diferentes marcadores moleculares reflete uma tendência na forma de acessar a variação genética das populações de organismos diversos. Além de ser uma técnica moderna e universal, os marcadores moleculares tem aumentado o poder de análise genética das pesquisas sobre variabilidade.

2.2.1. Marcadores microssatélites

Segundo Griffiths *et. al.*, (2000) o DNA eucariótico é constituído de genes de cópia única, DNA repetitivo e DNA espaçador. O DNA repetitivo consiste em múltiplas repetições em “*tandem*” de sequências curtas de nucleotídeos, podendo ter sequências funcionais e/ou sequências com funções desconhecidas. Essa classe de DNA repetitivo disperso no genoma, também é chamada de DNA microssatélite. É neste DNA repetitivo que se baseiam os marcadores microssatélites também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*), estes marcadores moleculares tem um comportamento Mendeliano e consistem de trechos de DNA de unidades mono-, di-, tri, tetra- ou penta-nucleotídicas repetidas ao acaso, dispersas por todo o genoma eucarioto (HAMADA *et al.*, 1982).

No genoma podem ser encontradas diferentes repetições microssatélites e estas são divididas em: 1) repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção; 2) repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases não repetidas; 3) repetições compostas, quando duas ou mais repetições (classes) de microssatélites estão dispostas adjacentes; 4) repetições simples, quando o microssatélite é formado por apenas uma repetição (classe). As repetições simples e compostas podem ser perfeitas ou imperfeitas (Figura 4) (BORÉM e CAIXETA, 2009).

A análise dos SSR é realizada por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), com o uso de dois *primers* complementares às regiões que flaqueiam as repetições. O polimorfismo de locos microssatélites é devido à diferenças no número de vezes (n) em que, por exemplo, um dinucleotídeo (AC)_n se repete naquele loco. Estas variações no número de repetições constituem-se, em última análise, em variações nos comprimentos dos segmentos detectados pela PCR e na separação de fragmentos amplificados em gel de eletroforese (POWELLA *et al.*, 2006).

A taxa de mutação nestas sequências repetidas pode ser até 100 vezes maior do que outras regiões do genoma, fazendo com que sejam consideradas, portanto, sequências de alta taxa evolutiva. Assim, o conteúdo informativo de um loco SSR é bastante alto, justamente por se tratar de seqüências de alta taxa evolutiva (LUTY, 1989). O notável valor desta classe de marcadores resulta da sua natureza multialélica, transmissão codominante, fácil detecção por PCR, relativa abundância, extensiva cobertura do genoma e necessidade mínima de DNA para análise genética.

Na literatura, o sistema SSR tem se mostrado mais eficiente do que os marcadores RFLPs e RAPDs, sendo amplamente desenvolvidos para muitas plantas e

animais, entretanto, eles são raramente desenvolvidos para fungos. No entanto, locos microssatélites têm sido descritos para vários fitopatógenos, como *Magnaporthe grisea* (BRONDANI *et al.*, 2000), *Phytophthora sojae* (ZHU *et al.*, 2004), *Crinipellis pernicioso* (GRAMACHO *et al.*, 2007), *Puccinia coronata* (DRACATOS *et al.*, 2006), *Lasiodiplodia theobromae* (CARDOSO e WILKINSON, 2008), entre outros.

Uma abordagem bastante interessante é o desenvolvimento deste tipo de marcador a partir de ESTs (*Expressed Sequence Tags*). Com a disponibilidade de grande número de sequências expressas e outros dados de sequências de DNA nos (*EST database*), o desenvolvimento de marcadores EST-SSR através da mineração de dados, tem se tornado uma prática segura, eficiente e de baixo custo.

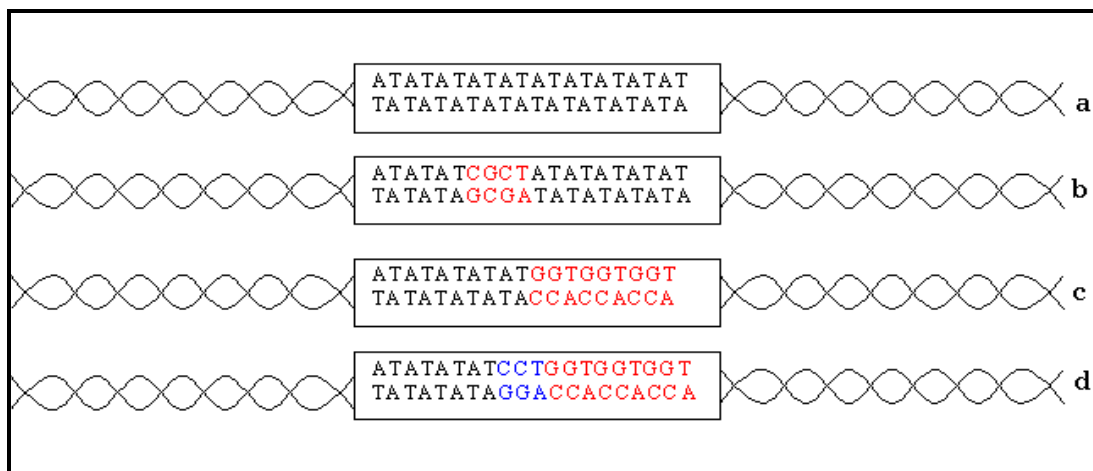


Figura 4. Esquema das diferentes repetições microssatélites encontradas no genoma eucarioto (a) simples perfeita, (b) simples imperfeita, (c) composta perfeita e (d) composta imperfeita. (BORÉM e CAIXETA, 2009).

2.3. Transcriptoma em fungos

Desde 1996, com o sequenciamento do primeiro genoma eucarioto da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, os avanços científicos na área genômica foram constantes, o que possibilitou através de técnicas especiais e auxílio da bioinformática a descoberta, manipulação e caracterização de um grande número de genes de diversos organismos.

A Genômica é uma nova ciência dentro da Genética caracterizada pela identificação, caracterização completa dos genes e pelo seqüenciamento em larga escala, possibilitando assim, a inferência de funções gênicas pela comparação de genes homólogos de funções conhecidas, depositadas em bancos de dados públicos. Essa

ciência pode ser dividida em genômica estrutural e genômica funcional. Um projeto de genoma estrutural consiste no sequenciamento de DNA genômico, gerando informações de regiões gênicas e intergênicas. Já o genoma funcional ou transcriptoma consiste no seqüenciamento de transcritos gênicos, tendo como principal objetivo o estudo da expressão gênica. A metodologia mais utilizada para esta análise baseia-se no isolamento e retro-transcrição de RNAs mensageiros, onde a sequência gerada de cada extremidade 5' e/ou 3' é denominada EST (*Expressed Sequence Tags*) (ADAMS, *et al.*, 1991). De acordo com Mir (2005), o transcriptoma é reflexo direto da expressão gênica e avalia o conjunto de transcritos de um organismo em determinada situação celular.

ESTs de fungos fitopatogênicos já foram obtidas para várias espécies: *Blumeria graminis*, *Magnaporthe grisea*, *Mycosphaerella graminicola*, *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*), *Ustilago maydis*, bem como para o fungo saprófito *Aspergillus nidulans* (SOANES e NICHOLAS, 2006).

A aplicação da análise genética molecular para o estudo de fungos fitopatogênicos conduziram à identificação e caracterização de uma coleção diversa de genes envolvidos na patogenicidade, biossíntese de compostos fitotóxicos, conidiogênese, formação do apressório, metabolismo de aminoácidos e genes envolvidos nas vias de sinalização conservadas (SOANES, *et al.*, 2002).

Os tipos de genes expressos na patogênese dependem do processo de infecção de cada fungo em particular. Alguns fungos degradam a cutícula e parede celular para entrar na planta, outros formam estruturas especializadas, como apressório para penetrar na epiderme, enquanto outros entram no hospedeiro por feridas ou aberturas naturais (BERGAMIN, *et al.*, 1995).

Muitas proteínas expressas por genes vitais para a habilidade do fungo em infectar a planta hospedeira, por exemplo, foram identificados por homologia com sequências que codificam componentes de vias de sinalização originalmente identificadas em *S. cerevisiae*. Estes incluem genes que codificam proteínas ativadas por mitógenos (MAP- *mitogen activated protein*) quinases (XU, 2000), proteínas quinases dependentes de AMP-cíclico (DEZWAAN *et al.*, 1999; MITCHELL e DEAN, 1995), adenilato ciclases (CHOI e DEAN, 1997) e receptores acoplados a proteínas G (LIU e DEAN, 1997) que são responsáveis por controlar diversos processos de diferenciação e crescimento celular, incluindo formação do apressório, crescimento da hifa invasiva e patogênese.

A descoberta dessas proteínas expressas por genes de patogenicidade também é devido à aplicação de técnicas de mutagênese aliada a genômica, a análise

bioinformática e busca por homologia em bancos de dados *online*, o que possibilitou o conhecimento de outros genes importantes, com funções na degradação de parede celular, resposta ao ambiente do hospedeiro e produção de toxinas (IDNURM e HOWLETT, 2001). Desta forma a análise transcriptômica tornou-se uma abordagem importante para avaliar, compreender e adquirir novas informações acerca do cenário molecular da interação planta-microrganismo, patogênese e colonização fúngica de plantas. A descrição de genomas fúngicos torna-se um recurso inestimável para pesquisadores que estudam diversos fungos, principalmente os fitopatógenos, que são os principais causadores de doenças em plantas.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *MICROCYCLUS ULEI*

Autores: Leandro Araujo de Sousa, Dominique Garcia, Daniela Martins Koop, Julio Cezar Mattos Cascardo

Artigo a ser submetido.

AVALIAÇÃO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO* DE *MICROCYCLUS ULEI*

Leandro Araujo de Sousa, Dominique Garcia, Daniela Martins Koop, Julio Cezar Mattos Cascardo.

Resumo

O fungo ascomiceto *Microcyclus ulei* é um parasita obrigatório da seringueira (*Hevea sp.*), e agente patológico do Mal das folhas, doença endêmica da América Latina. Da mesma forma que diversos fungos obrigatórios ou biotróficos, o crescimento do *M. ulei* em meio de cultura BSA é lento. Objetivando-se aumentar a produção de micélio, concentrações de 0.01, 0.1, 1.0, 2.0 e 4.0% de glicose, frutose e maltose e de 0.5, 1.0 e 2.0% de sacarose no meio BSA foram testadas. O meio BSA (2%) apresentou a maior produção de micélio. Nas fontes orgânicas de nitrogênio foram testadas a cisteína (1 mM) e a metionina (1 mM) as quais foram adicionadas de forma separada e conjunta no meio BSA, com ou sem cloridrato de lisina (0,0547 mM), triptofano (0,012 mM) e treonina (0,024 mM). Meio BSA modificado enriquecido com cisteína favoreceu o crescimento radial da colônia, apresentando maior alongamento das hifas. As fontes de nitrogênio inorgânicas testadas (NaNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e NH_4Cl com concentração final equivalente a 0,075 M de nitrogênio) tiveram um efeito negativo comparado com o meio BSA modificado. Além do BSA, foram testados dois meios sintéticos CPD e meio mineral e três meios semi-sintéticos PDA, YPD e meio de Silva-Pinhati. Os meios contendo amido permitiram maior crescimento micelial do *Microcyclus ulei*.

Abstract

The ascomycete fungus *Microcyclus ulei* is an obligate parasite of the rubber tree (*Hevea sp.*), and pathological agent from the SALB, a disease endemic in Latin America. Just as many biotrophic fungi or obligatory, the growth of *M. ulei* BSA in culture medium is slow. Aiming to increase the production of mycelium, concentrations of 0.01, 0.1, 1.0, 2.0 and 4.0% glucose, fructose and maltose and 0.5, 1.0 and 2.0% sucrose in the middle BSA were tested. Mean BSA (2%) had the highest production of mycelium. In the organic sources of nitrogen were tested cysteine (1 mM) and methionine (1 mM) which were added separately and together in the middle of BSA, with or without lysine hydrochloride (0.0547 mM), tryptophan (0.012 mM) and threonine (0.024 mM). BSA modified medium enriched with cysteine favored the radial growth of the colony, with higher elongation of hyphae. The tested inorganic nitrogen sources (NaNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and NH_4Cl final concentration equivalent to 0.075 M nitrogen) had a negative effect compared with medium modified BSA. In addition to BSA, we tested two synthetic means and through CPD and mineral resources three semisynthetic PDA, and YPD medium Silva-Pinhati. Media containing starch allowed greater mycelial growth of *Microcyclus ulei*.

1. INTRODUÇÃO

O fungo *Microcyclus ulei* é um parasita obrigatório da seringueira (*Hevea sp.*) que infecta e se desenvolve nos tecidos foliares do hospedeiro. Apesar de ser um parasita obrigatório o *M. ulei* pode crescer *in vitro* em meio sólido complexo contendo uma grande variedade de compostos orgânicos, agindo assim como um saprófito facultativo.

Um meio de cultura adequado deve ser uma mistura dos nutrientes necessários ao metabolismo e crescimento do microrganismo e um dos fatores mais importantes para o estabelecimento de um bom meio nutritivo sólido é a utilização de fontes adequadas de C e de N, bem como uma relação otimizada entre estes dois nutrientes (BARBOSA *et al.* 2002).

Os primeiros trabalhos de isolamento e cultivo do *M. ulei* foram realizados por Junqueira *et al.* (1984), onde foram testados uma ampla gama de meios de cultura para o crescimento *in vitro*. Dos dezenove meios de cultura testados, BSA (MC18, MC17 e MC10) foram os melhores para o crescimento, com maior aumento do peso do micélio com a idade das culturas. Os componentes comuns utilizados nesses meios incluem extrato de batata, fosfato de potássio monobásico e fitona. Para a esporulação, a produção máxima de conídios foi obtida nas culturas mantidas nos meios BSA (MC3 e MC7) complementados com aminoácidos. Os componentes em comum em ambos os meios incluem sacarose, fosfato de potássio monobásico e o produto Panvit constituído por diversas vitaminas, sais minerais e aminoácidos.

Atualmente o meio BSA (MC 6) modificado proposto por Junqueira *et al.* (1984) é o meio utilizado para o cultivo do *M. ulei*, entretanto, o crescimento micelial é demorado e a quantidade de inóculo produzida em meio de cultura varia bastante com o isolado. As informações na literatura sobre a fisiologia, crescimento micelial e aquisição de nutrientes pelo *M. ulei* são escassas. Portanto, tornam-se necessários estudos mais abrangentes sobre os aspectos nutricionais deste fitopatógeno.

Diante do descrito, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de diversos meios de cultura, concentrações de sacarose, variação de aminoácidos, fontes de carbono e fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico, no crescimento da forma imperfeita de *M. ulei*. Além disso, como complemento, observações microscópicas foram realizadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. O Fungo

O isolado (FTP31) de *Microcyclus ulei* foi isolado da cultivar de seringueira SIAL842 com resistência parcial na Plantação Michelin da Bahia (Ituberá, BA) e cultivado na micoteca do Laboratório de fitopatologia da PMB no meio BSA (MC6) proposto por Junqueira *et al.* (1984), modificado por Mattos (1999) devido a ausência do Panvit no mercado (complexo de sais minerais, vitaminas e aminoácidos).

2.2. Cultivo

Três a quatro fragmentos (5 a 6 mm) de micélio foram repicados em condições assépticas e colocados em cada placa de Petri contendo aproximadamente 20 mL de meio de cultura. Em seguida as placas foram incubadas em BOD a 24 °C por um período de 31 dias. Foram realizadas quatro réplicas para cada meio de cultura.

2.3. Variação dos meios de cultura utilizados para fungos de cultivo lento *in vitro*

No primeiro ensaio, avaliou-se o crescimento do isolado em diferentes meios de cultura. Utilizou-se Meio BSA (MC6) proposto por Junqueira *et al.* (1984) [extrato de batata (25%), sacarose (1%), fosfato de potássio monobásico (0,2%), Ágar Bacteriológico (2%) e os aminoácidos (cloridrato de lisina a 10.000 ppm, triptófano a 2.500 ppm e treonina a 2.500 ppm)], Meio PDA (Becton Dickinson, França) a 3,9%, Meio YPD [extrato de levedura (1%), peptona de carne bacteriológica (2%), dextrose (2%) e Ágar (2%)], Meio CPD [peptona (2%), glicose(2%) e Ágar (2%)], Meio A Agar modificado (Silva-Pinhati *et al.*, 2005) [dextrose (0,5%), NaCl(0,1%), peptona(0,1%), extrato de malte(0,5%), farinha de soja(0,1%), farinha de aveia(0,1%), caseína sem vitaminas(0,1%) e Ágar (2%)] e Meio mineral [KCl(0,02%), extrato de levedura(0,5%), glicose(1%), NH₄H₂PO₄(0,1%), MgSO₄ 7H₂O(0,02%), CuSO₄5H₂O (5%), ZnSO₄ 7H₂O (1%) e Ágar (2%)].

2.4. Variação das fontes de carbono

Para se avaliar diferentes fontes de carbono (glicose, frutose e maltose), foi adicionadas nas seguintes proporções 0,01%, 0,10%, 1%, 2% e 4%, no meio BSA modificado sem extrato de batata e sem sacarose. O crescimento do isolado no meio BSA com três concentrações de sacarose (0,5%, 1% e 2%) foi também avaliado.

2.5. Variação das fontes de nitrogênio

Como fonte de nitrogênio orgânico estudou-se o efeito dos aminoácidos cisteína (1 mM) e da metionina (1 mM) no crescimento do *M. ulei*, as quais foram adicionadas de forma separada e em conjunta no meio BSA com ou sem cloridrato de lisina (0,0547 mM), triptofano (0,012 mM) e treonina (0,024 mM) . No último ensaio, verificou-se o crescimento do isolado cultivado em meio BSA contendo diferentes fontes inorgânicas de nitrogênio, NaNO₃, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄ e NH₄Cl numa concentração final equivalente a 0,075 M de nitrogênio.

2.6. Avaliação dos ensaios

Após 31 dias de cultivos, o crescimento do micélio foi observado utilizando um estereo-microscópio (Leica, ampliação 8x), equipado com câmera digital interna (*software* Leica Application Suite Educational Zoom LAS EZ). Para avaliar o crescimento foi considerando dois critérios: o diâmetro maior da colônia, e o peso do micélio seco após 48 horas na estufa a 60 °C. Os dados foram submetidos à análise de variância (Teste de Duncan para diferenciar os grupos homogêneos) utilizando SAS 9.1.3, SAS Institute Inc, Cary, NC, USA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito de meios de cultura utilizados para fungos de cultivo lento *in vitro*

Dentre os meios de cultura testados, o melhor meio para o crescimento do isolado FTP31 foi o BSA modificado (Fig. 1-a), seguido do Meio PDA (Fig. 1-b).

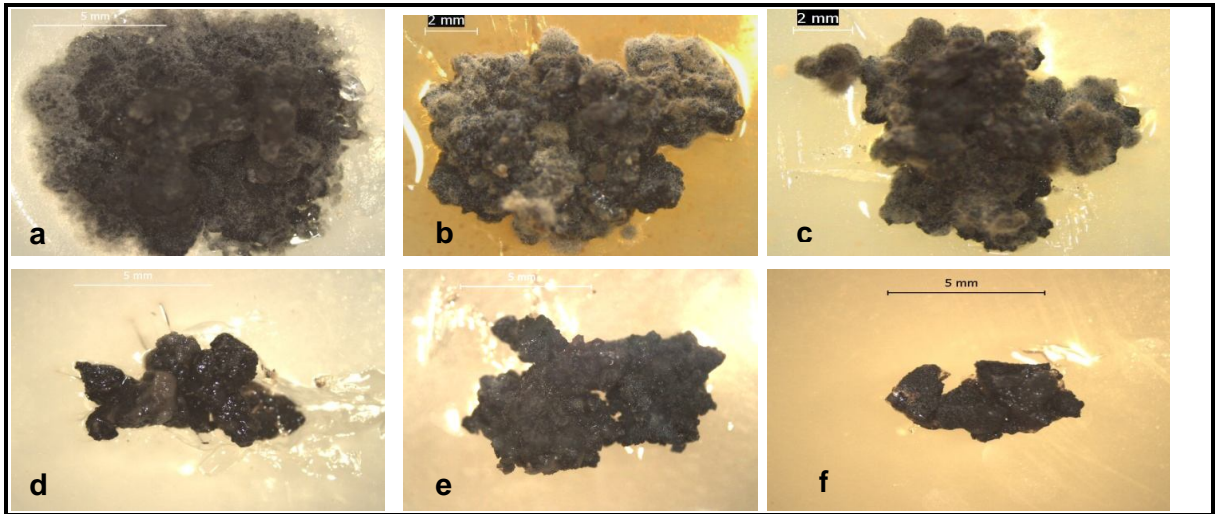


Figura 1. Crescimento da cepa de *Microcyclus ulei* FTP31 em diferentes meios de cultura: (a) BSA modificado, (b) BDA, (c) Meio de Silva-Pinhati, (d) Meio Mineral com glicose e extrato de levedura, (e) Meio peptona glicose e Agar (f) Meio YPD.

As mediações do diâmetro (Fig. 2-a) e do peso seco do micélio (Fig. 2-b) confirmam as observações iniciais sendo o maior diâmetro e peso seco para as colônias crescidas no Meio BSA modificado e o menor diâmetro e peso seco para os meios Mineral e YPD.

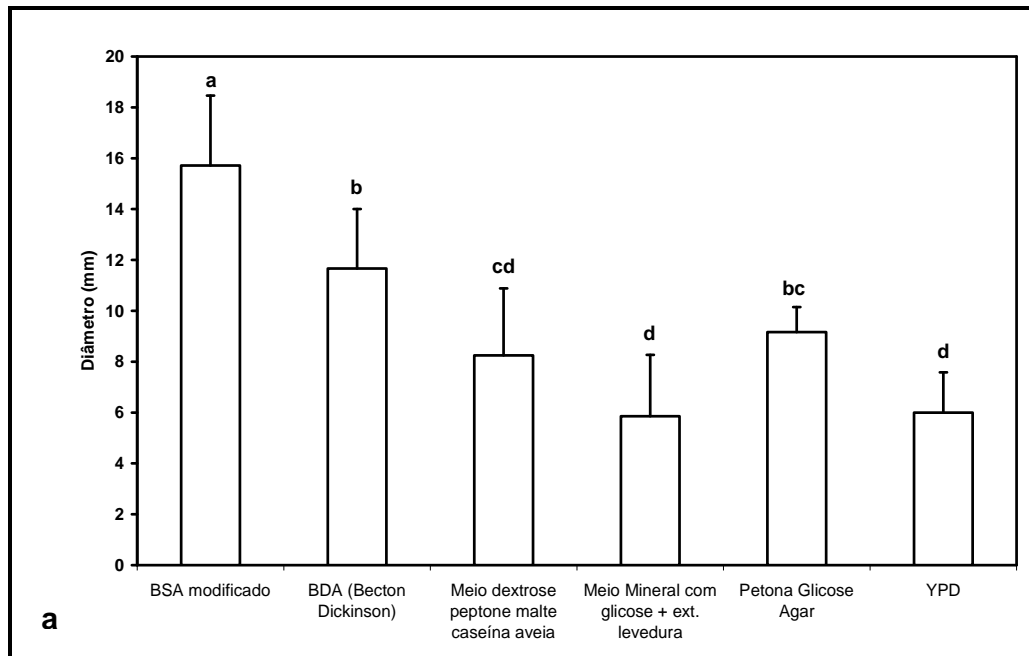


Figura 2. Efeito de diferentes meios de cultura no crescimento de colônias de *Microcyclus ulei*. (a) crescimento radial, (b) peso seco.

BSA modificado é um meio complexo suplementado com aminoácidos que funcionam como fatores de crescimento e auxiliam na esporulação fúngica. BDA é considerado um meio universal, pois suporta o crescimento da maioria dos fungos, usado amplamente em laboratórios de fitopatologia, principalmente para isolamento e manutenção de culturas (ALFENAS e MÁFIA, 2007). Os resultados obtidos nesses meios se devem, provavelmente, aos componentes da batata, elemento natural rico em amido, polissacarídeo de reserva encontrado nas células vegetais, sendo muito assimilado por fungos biotróficos. Além disso, a batata contém proteínas, glicídios, lipídeos, cálcio, ferro e grande quantidade de fósforo contendo também vitaminas A, B1, B2, B3 e vitamina C (FRANCO, 1998). O amido e lactose foram as fontes de carbono que mais favoreceram o crescimento de isolados do fungo ascomiceto *Verticillium lecanii* após 20 dias de cultivo (BARBOSA *et al.*, 2002). Os meios Silva-Pinhati, CPD e YPD tiveram pouco efeito no desenvolvimento fúngico, caracterizado pela formação de hifas novas hialinas, mas sem crescimento micelial. O Meio mineral não teve nenhum efeito sobre o crescimento fúngico, fato esse, devido à composição do meio que possui cobre e zinco metais pesados que segundo Black, (2002) provocam a inibição enzimática por se ligarem a sítios da molécula, alterando sua forma permanentemente e conseqüentemente inativando a enzima. Na literatura o Meio de Silva-Pinhati é utilizado para o cultivo de fungos basidiomicetos que fazem simbiose com formigas cortadeiras. YPD é um meio rico em nitrogênio orgânico e geralmente usado para cultivo de leveduras especialmente *Saccharomyces spp.* CPD e Meio mineral com glicose são meios complexos utilizados rotineiramente para cultivo do fungo da vassoura-de-bruxa *Moniliophthora perniciosa*.

O resultado do crescimento fúngico obtido nesse ensaio sugere que *M. ulei* tenha boa capacidade de desdobrar amido como fonte de carbono, produzindo diversas amilases.

3.2. Efeito da fonte de carbono

No ensaio com variação de fontes de carbono, o isolado FTP31 cresceu apenas no meio BSA controle e nos demais tratamentos houve pouco ou nenhum desenvolvimento micelial (Figura 3). Esse resultado indica que, o extrato de batata ou amido é um componente indispensável para o cultivo *in vitro* do *M. ulei*, sendo que a sacarose presente no meio BSA foi a melhor opção como fonte de carbono. Muitos fungos utilizam glicose como fonte de carbono, porém, vários outros açúcares podem ser aproveitados (CARLILE & WATKINSON, 1994). Segundo Lima *et al.*, (2002) a sacarose é

o principal carboidrato transportado no floema de plantas superiores, o que corrobora com os dados apresentados na figura 4. Supõe-se que o fungo estar adaptado a utilizar a sacarose presente nos tecidos da seringueira, possuindo assim, as enzimas específicas para o catabolismo e assimilação desta fonte de carbono.

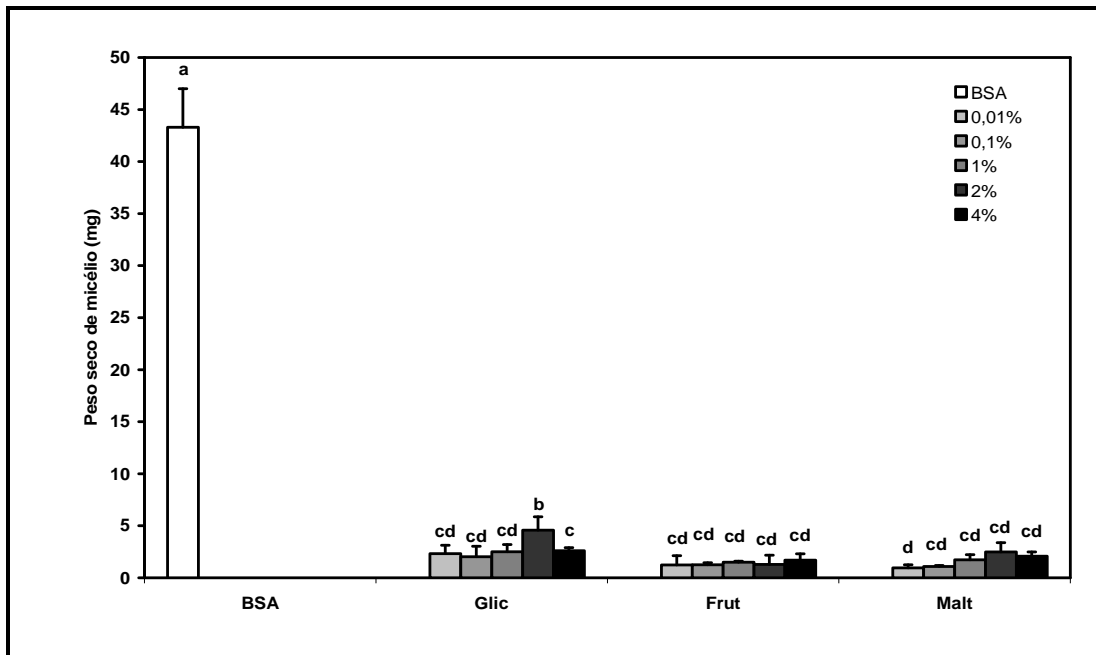


Figura 3. Efeito de concentrações de Glicose (Gli), Frutose (Frut) e Maltose (Malt) no crescimento de colônias de *Microcyclus ulei*.

Em relação ao crescimento do isolado FTP31 no ensaio com diferentes concentrações de sacarose no meio BSA, os resultados não tiveram diferenças significativas, pois o mesmo teve crescimento micelial nas três concentrações 0,5%, 1% e 2%, obtendo maior diâmetro da colônia no meio BSA 0,5% (Fig. 4-a). Apesar de ter diferenças pouco significativas, o meio que apresentou maior peso seco foi o BSA 2% (Fig. 4-b).

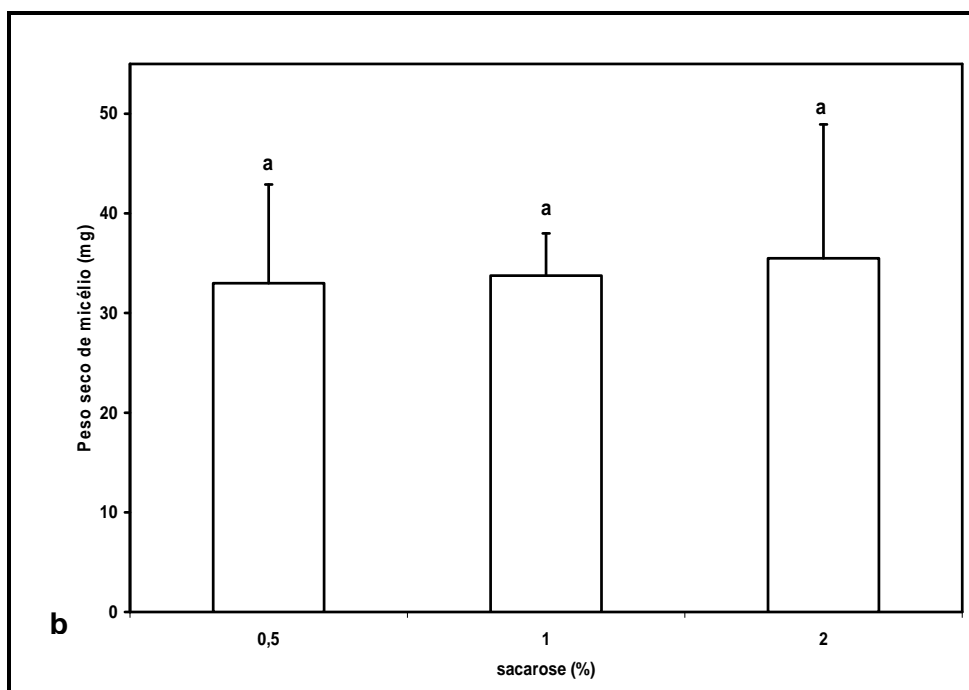
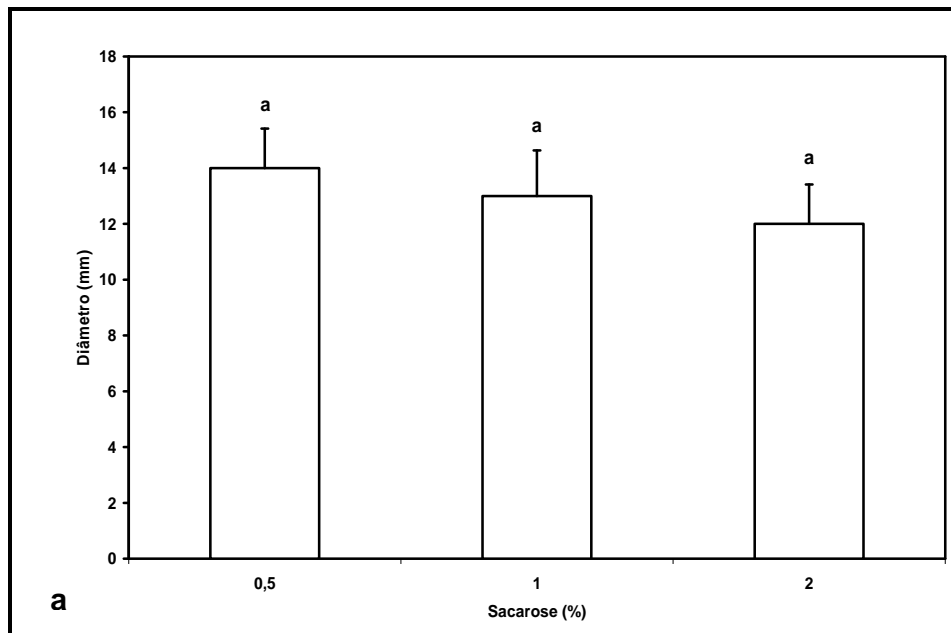


Figura 4. Efeito da concentração de sacarose no crescimento de colônias de *Microcyclus ulei*. (a) crescimento radial, (b) peso seco.

3.3. Efeito da fonte de nitrogênio

No ensaio realizado com diferentes aminoácidos, o meio que proporcionou maior crescimento radial das colônias foi o BSA enriquecido com cisteína (Fig. 5-a), caracterizado pela formação de hifas mais alongadas. Apesar de ter um crescimento radial maior, a quantidade de micélio produzido não é significativamente diferente do meio BSA e do meio BSA enriquecido com cisteína e metionina (Fig. 5-b).

A molécula de cisteína possui em sua cadeia lateral o tiol que frequentemente participa de reações enzimáticas, por sua natureza nucleofílica. O tiol é suscetível à oxidação para gerar o derivado dissulfeto “cistina”, que têm um importante papel estrutural em muitas proteínas. As ligações dissulfetos agem no dobramento e estabilidade de algumas proteínas. Conseqüentemente a cisteína têm um papel fundamental na manutenção da estrutura terciária de proteínas (SEVIER e KAISER, 2002). L-cisteína é o mais importante composto contendo enxofre, sendo requerida para a biosíntese de um número de substâncias bioquímicas, como a L-metionina, coenzima A, a biotina, o ácido lipóico e a glutatona que é um aminoácido antioxidante muito importante nos sistemas vivos. Além disso, algumas proteínas com atividade biológica são dependentes da cisteína, estas incluem as ubiquitina ligases, que transferem ubiquitina para proteínas, e caspases, que participam de proteólise na apoptose celular. Outras proteínas dependem da cisteína no seu centro catalítico como a inteína e a ribonucleotídeo redutase (WADA e TAKAGI, 2006).

Para o fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum* a transição da fase micelial para fase de levedura depende da presença de cisteína no meio de cultura (MARESCA *et al.*, 1981). Assim a cisteína tem um papel chave na formação de estruturas celulares e processo de morfogênese desse fungo.

Devido a sua natureza multifuncional, a cisteína é um elemento essencial que auxiliou o alongamento das hifas no meio de cultura e favoreceu no caso do cultivo do *Microcyclus ulei* o crescimento radial.

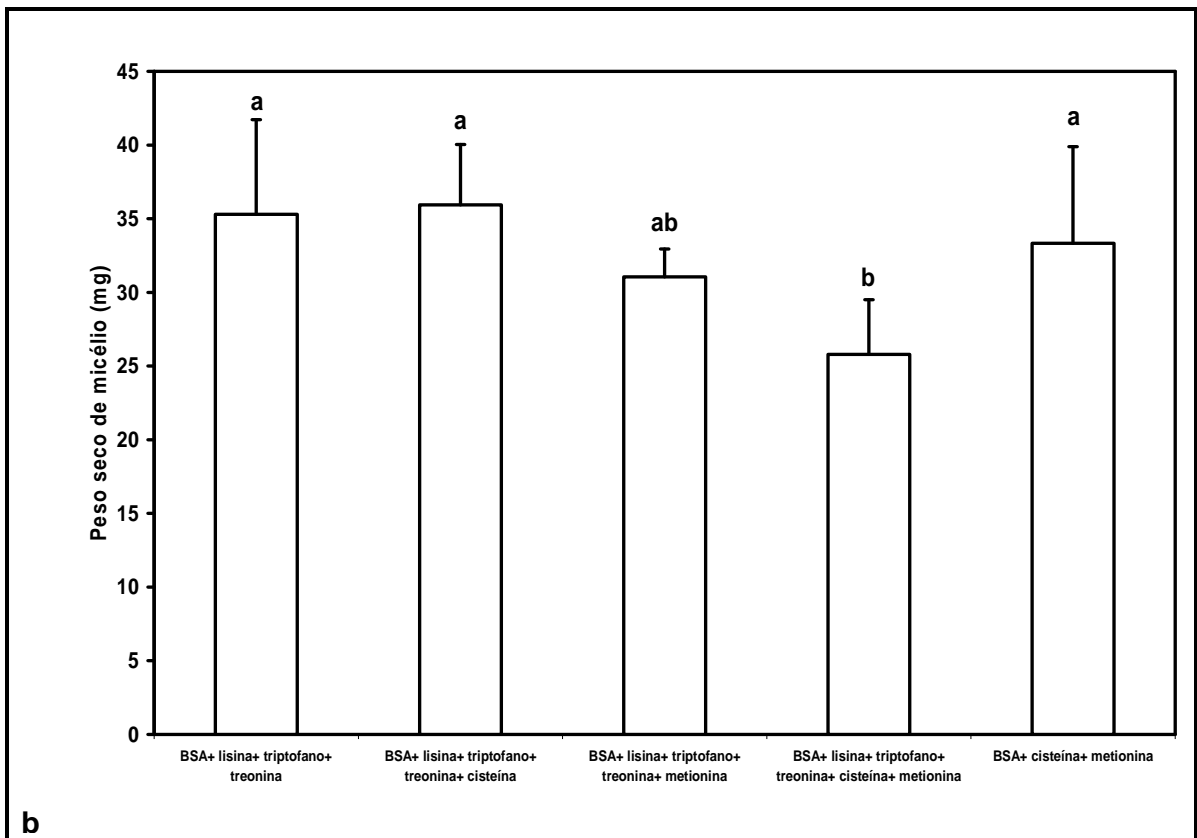
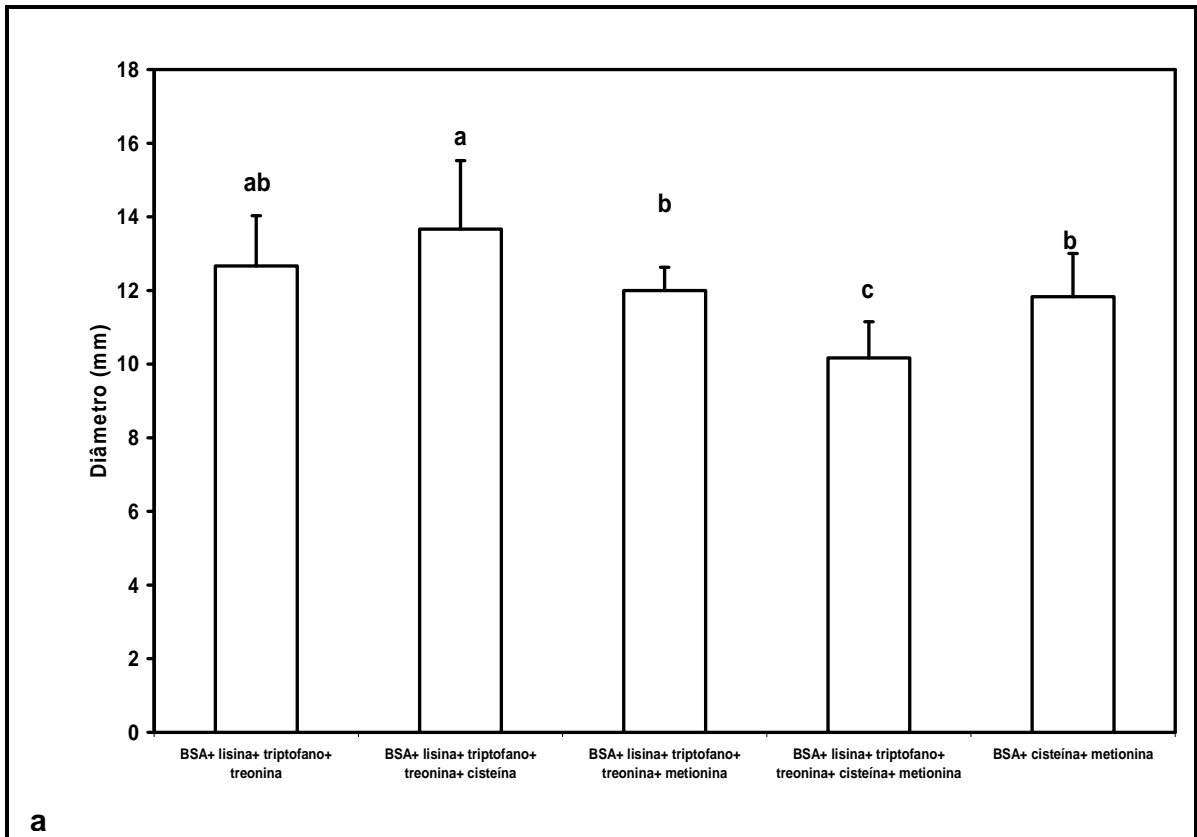


Figura 5. Efeito de diferentes aminoácidos no crescimento de colônias de *Microcyclus ulei*. (a) crescimento radial, (b) peso seco. Cis: cisteína; Met: metionia; Lis: cloridrato de lisina; Tri: triptofano; Tre: treonina.

No ensaio realizado com diferentes fontes de nitrogênio inorgânico, o isolado FTP31 desenvolveu-se em todos os meios, porém o melhor resultado foi obtido no meio BSA “controle” (Fig. 16-a e 6-b). Os demais meios, nos quais foram adicionadas as fontes de nitrogênio inorgânico tiveram resultados semelhantes, não tendo diferença estatística entre eles. Em um estudo nutricional realizado com o fungo *B. euphorbiae* (PENARIOL, *et al.*, 2008) o maior crescimento foi no meio contendo nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, ao contrário dos resultados obtidos para o *M. ulei* que assimila melhor fontes de nitrogênio orgânico.

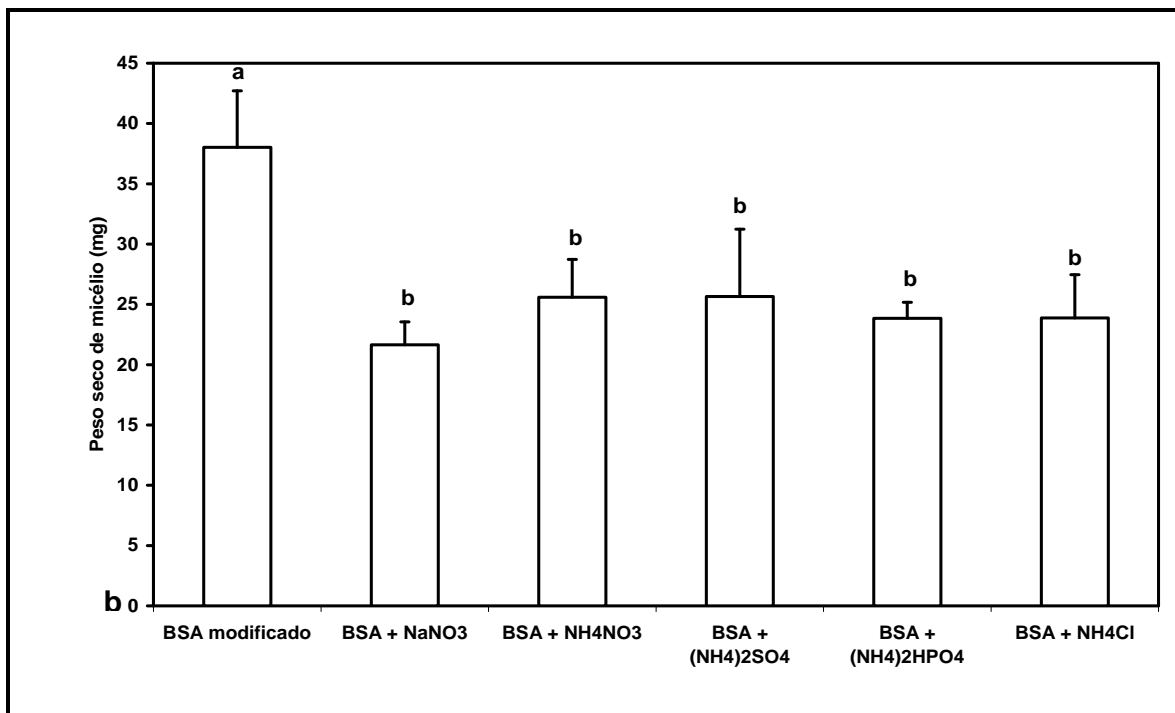
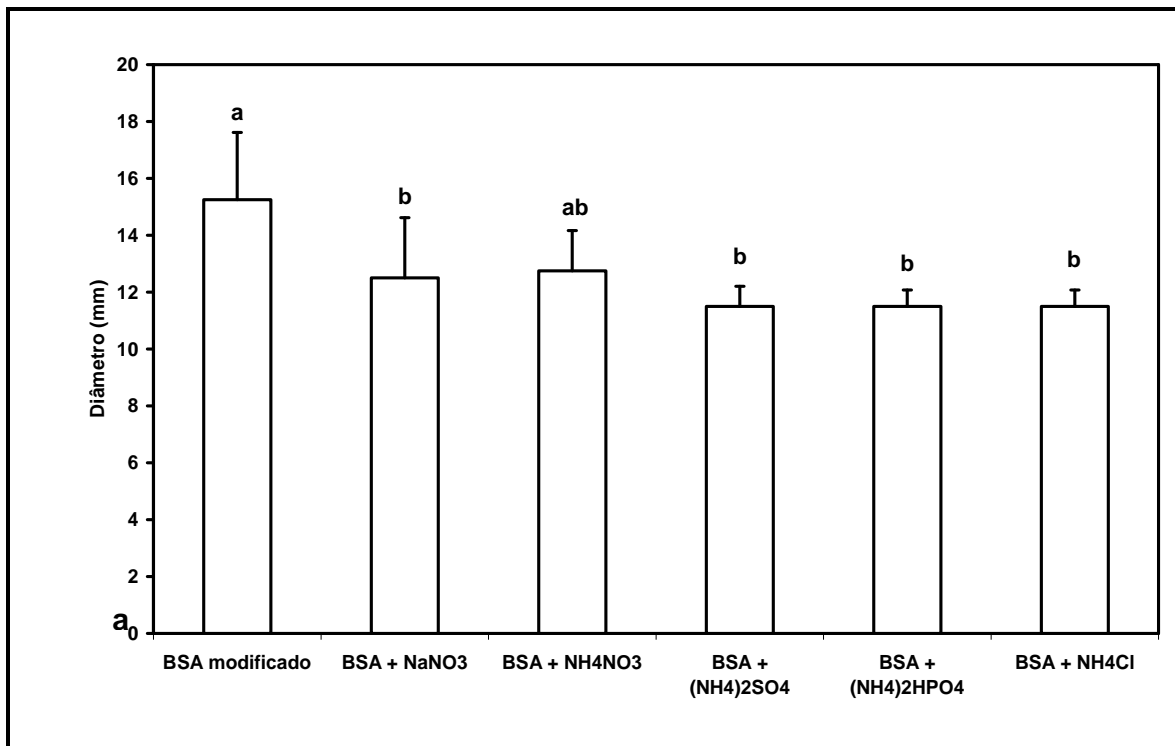


Figura 6. Efeito de fontes de nitrogênio inorgânico no crescimento de colônias de *Microcyclus ulei*. (a) crescimento radial, (b) peso seco.

4. CONCLUSÕES

- O cultivo *in vitro* do fungo em meios contendo amido permitiram maior crescimento micelial do *Microcyclus ulei*.
- Dentre as fontes de carbono testadas, a sacarose proporcionou o melhor crescimento micelial.
- Todas as fontes de nitrogênio inorgânicas testadas NaNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e NH_4Cl tiveram pouco efeito no crescimento micelial comparado ao meio BSA modificado.
- O Meio BSA modificado enriquecido com o aminoácido cisteína (1mM), favoreceu o crescimento radial da colônia, apresentando maior alongamento das hifas.

CAPÍTULO 3

CONSTRUÇÃO E ANOTAÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE ESTs DE MICÉLIO DE *MICROCYCLUS ULEI*

Autores: Leandro Araujo de Sousa, Julio Cezar Mattos Cascardo, Dominique Garcia.

Artigo a ser submetido.

CONSTRUÇÃO E ANOTAÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE ESTs DE MICÉLIO DE *MICROCYCLUS ULEI*

Leandro Araujo de Sousa, Julio Cezar Mattos Cascardo, Dominique Garcia

Resumo

As pesquisas relacionadas com o fungo *Microcyclus ulei* são limitadas, e são escassos estudos da biologia molecular do fungo e sua interação com a planta hospedeira "serigueira". A criação de biblioteca de cDNA e análise das sequências expressas é uma abordagem útil, bastante utilizada para entender o funcionamento das vias metabólicas dos organismos. O objetivo deste estudo foi identificar genes relacionados à patogenicidade e vias metabólicas do *M. ulei* por meio da construção de uma biblioteca *full-length* de cDNA de micélio. Após criação da biblioteca foi obtido um unigen com 409 ESTs. A análise de similaridade das ESTs revelou que (76%) não tiveram homologia (No hits), (10.5%) indicaram genes codificando proteínas com funções desconhecidas e (13.5%) mostraram similaridade com genes codificando proteínas com funções conhecidas envolvidas no processo de patogênese, metabolismo de ácidos nucleicos; biosíntese de proteínas, metabolismo de lipídios, metabolismo de aminoácido, biosíntese de melanina, protein binding; atividade endonuclease; metabolismo de carboidrato/glicólise, metabolismo de etanol, ciclo de energia, ciclo do citrato, regulação de stress oxidativo, atividade catlítica; proteína de transporte; proteína de modificação traducional, proteína de regulação, sinalização celular, estrutura celular e complexo de proteínas ribossomais.

Abstract

The research related to the fungus SALB are limited, and there are few studies of the molecular biology of the fungus and its interaction with the host plant "serigueira". Creation of cDNA library and expressed sequence analysis is a useful approach, widely used to understand the functioning of metabolic pathways of organisms. The aim of this study was to identify genes related to pathogenicity and metabolic pathways of *M. ulei* by building a library of full-length cDNA of mycelium. After creation of the library was obtained with a Unigen 409 ESTs. The similarity analysis revealed that the ESTs (76%) had no homology (No hits) (10.5%) indicate genes encoding proteins with unknown function and (13.5%) showed similarity to genes encoding proteins with known functions involved in the pathogenesis, metabolism of nucleic acids, protein biosynthesis, lipid metabolism, amino acid metabolism, biosynthesis of melanin, protein binding, endonuclease activity, carbohydrate metabolism / glycolysis, metabolism of ethanol, power cycle, citrate cycle, regulation of oxidative stress, catalytic activity; transport protein; translational protein modification, protein regulation, cell signaling, cell structure and ribosomal protein complex.

1. INTRODUÇÃO

Muitos microrganismos patogênicos principalmente os fungos causam doença na seringueira. O Mal das folhas (SALB, South American leaf blight) causado pelo ascomicota *Microcyclus ulei*, é uma das mais destrutivas doenças da seringueira.

Poucos aspectos sobre a biologia, fisiologia e diversidade genética do *M. ulei* tem sido estudado, assim torna-se necessário pesquisas que ampliem o conhecimento sobre este fitopatógeno, em especial, estudos abrangentes da biologia molecular do fungo e sua interação com a planta hospedeira. Nesse sentido, a estratégia de obtenção de Etiquetas de Sequências Expressas (ESTs) pode ser uma ferramenta eficaz na identificação de genes conservados e genes desconhecidos envolvidos nas vias metabólicas e patogênese do *M. ulei*.

A construção de biblioteca de DNA complementar (cDNA) representa o conjunto de RNAs de uma determinada célula ou tecido, assim a análise dos genes expressos (ESTs) é uma abordagem bastante utilizada na tentativa de entender o funcionamento do metabolismo dos mais diversos organismos (PROSDOCIMI *et al.*, 2003). O sequenciamento em larga escala de bibliotecas de cDNA por meio de etiquetas de sequências expressas, parece ser uma poderosa ferramenta para descobrir novos genes e gerar perfis de expressão gênica de diferentes células e tecidos sob diferentes fases do desenvolvimento e condições fisiológicas (OHLROGGE e BENNING, 2000). Esta técnica permite identificar genes rapidamente e executar amplas análises funcionais de milhares deles.

A abordagem de ESTs tem se tornado cada vez mais utilizada para anotação de sequências genômicas completas de organismos eucariotos, pois podem dar evidências biológicas para centenas de genes já identificados em diversos outros organismos ou indicar a presença de novos genes. Hoje, mais de dez milhões de ESTs estão disponíveis através do “banco de dados de ESTs” (db EST) do GenBank (VETTORE *et al.*, 2001). Atualmente existem bancos de dados de sequências ESTs específicas de origem fúngica como o COGEME, o Pfam e o Whitehead Fungal Prot.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Micélio cultivado *in vitro*

Amostras do micélio da linhagem (FTP31) de *Microcyclus ulei* isolada do cultivar de seringueira SIAL842 e cultivada em meio BSA (MC6) proposto por Junqueira *et al.* (1984) proveniente da micoteca do Laboratório de fitopatologia da Plantação Michelin da Bahia (Ituberá, BA) foram armazenadas a 24 °C até o momento da extração do RNA.

2.2. Extração do RNA

O RNA total foi extraído a partir de 200 mg de micélio fresco utilizando-se o RiboPure™ Kit (Ambion). Após a extração, o RNA foi ressuspenso em 50 µL de *Elution Buffer* e a integridade e pureza do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5mg/mL). A quantificação foi realizada através da análise comparativa com DNA de concentração conhecida, Lambda DNA (Invitrogen).

2.3. Síntese do cDNA

O cDNA foi obtido usando o Creator SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech) que possibilita a construção de bibliotecas de cDNA direcionalmente clonadas a partir de pequena quantidade de RNA total ou do RNA poly A+ (Figura 1). Para isso, foram utilizados na síntese da primeira fita 5,5 µL do RNA total, 1µL do SMART IV Oligonucleotide, 1µL do primer CDS III/3' PCR Primer. Esse mix foi brevemente misturado, centrifugado, e em seguida incubado a 72° C por dois minutos. Após esse período esse mix foi colocado no gelo por dois minutos, e em seguida foi dado spin breve de acordo com o protocolo da SMART PCR cDNA Synthesis Kit com pequenas modificações.

Após essa primeira etapa, foi adicionado ao tubo 3µL do 5X First-Strand buffer, 1,5 µL de DTT (20 mmol . L-1), 1 µL de dNTP Mix (10 mmol . L-1), 1µL da enzima Reverse Transcriptase e 1µL de inibidor de RNase (RNase out Invitrogen) obtendo-se um volume total de 15 µL. O tubo foi incubado a 42° C por 1 hora no termociclador.

Para a síntese da segunda fita foram utilizados 2 µL dos 15µL obtidos na primeira fita, 80 µL de H2O deionizada, 10 µL de tampão 10X Advantage 2 PCR Buffer, 2 µL de 50X dNTP Mix, 2µL do 5' PCR primer, 2 µL do CDS III/3' PCR Primer e 2 µL da 50X Advantage 2 Polymerase Mix, totalizando um volume de 100µL. As condições do PCR foram: 95° C por 1 minuto; 95°C por 30 s; 68° C por 6 min em 23 ciclos.

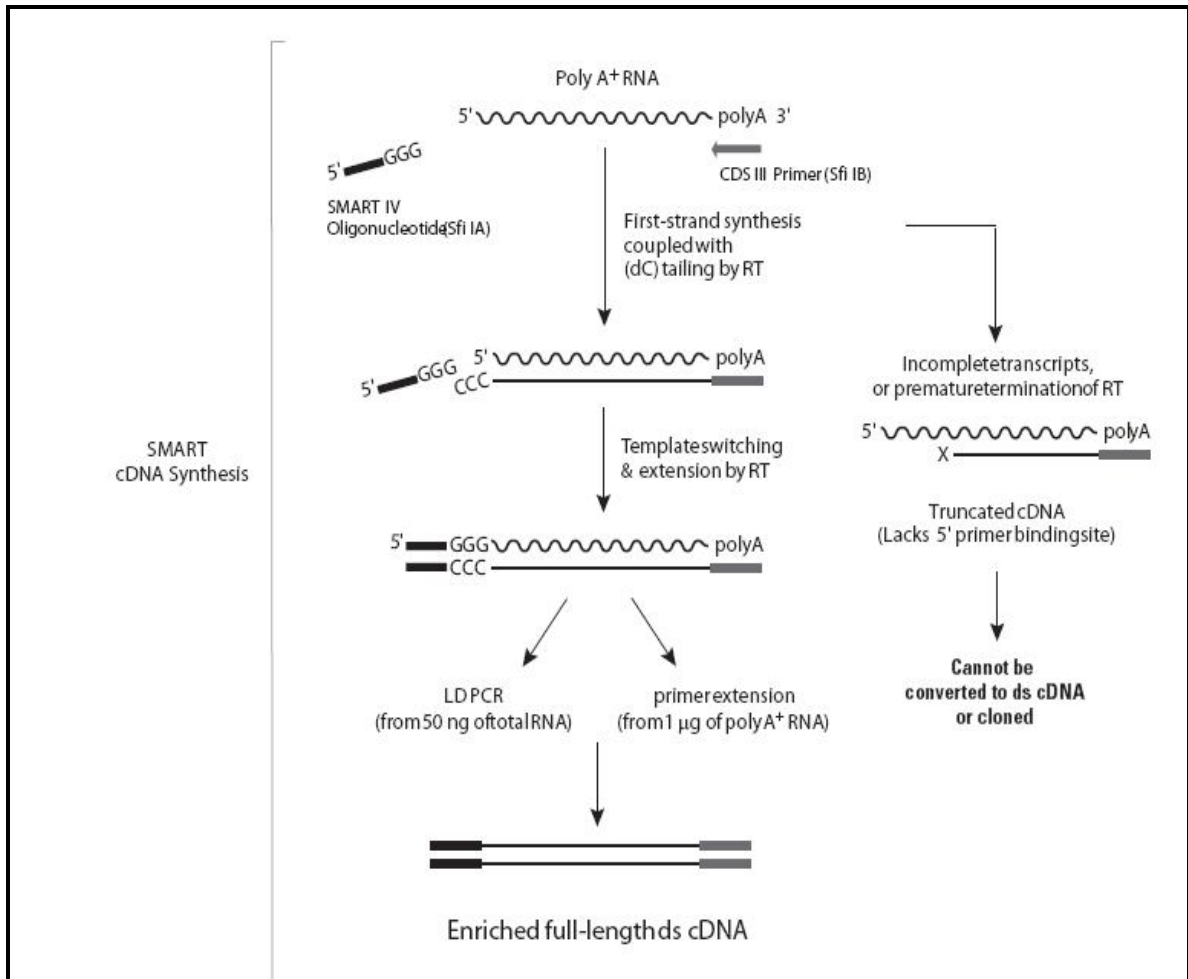


Figura 1. Fluxograma do protocolo Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit

2.4. Fracionamento do cDNA

Com o intuito de selecionar fragmentos maiores, o fracionamento do cDNA foi feito em cromatografia em gel de filtração (CHROMA SPIM 1000, Clontech), conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

2.5. Ligação

Os fragmentos selecionados no fracionamento foram ligados ao vetor pTZ57R/T (Fermentas). Foram utilizados na ligação: 2 µL do vetor pTZ57R/T; 6 µL da amostra de cDNA precipitada; 4 µL de Tampão 5X; 1 µL de T4 DNA ligase 5 u/µL e 7 µL de H₂O Nuclease Free, de acordo com as recomendações do fabricante. Essa reação foi mantida à 8° C por 72h. O mix apresentou um volume final de 20 µL que foi utilizado para transformação das cepas eletrocompetentes.

2.6. Transformação

Foram utilizados 4 µL da ligação na transformação das células eletrocompetentes de *Escherichia coli* ElectroMAX DH10B (Invitrogen). Na câmara de fluxo laminar, foram adicionados numa cuveta estéril BIO-RAD Gene Pulser cuvette 0,2 cm electrode, previamente resfriada, 20 µL da célula e posteriormente 4 µL da ligação. A mistura foi eletroporada em BIO-RAD *Micro Pulser*TM utilizando-se o programa EC2 (*Escherichia coli* 2) pulso automático. Em seguida foi adicionado à cuveta 1000 µL de meio SOC e a amostra foi incubada à 37° C durante uma hora e 200rpm.

O conteúdo da cuveta foi transferido cuidadosamente para um tubo estéril e misturado à 1200 µL de Glicerol 16%. Esse mix da transformação foi aliqotado em tubos *ependorf* 200 µL contendo 100 µL cada e armazenado à -80° C para os posteriores plaqueamentos. Os clones foram plaqueados em meio LB sólido com Ampicilina 50mg/L utilizando-se: 10 µL de 1 mol . L-1 IPTG; 50 µL X-GAL 20mg/mL e 140 µL de meio LB até secar completamente. Após esse período, 10µL da transformação foram diluídos em 90 µL de meio LB e adicionados em cada placa.

Essas placas foram incubadas em BOD à 37° C durante 16h. As colônias brancas foram pré-selecionadas para evitar falsos positivos. As culturas permanentes foram feitas em placas de Elisa fundo U, contendo 70 µL de meio LB com Ampicilina 50mg/L e crescidas à 37° C e 260rpm durante 16h. Após esse período as placas foram centrifugadas por 1 min; acrescidas de 70 µL de Glicerol 16%; seladas, identificadas e estocadas em ultrafreezer à -80°C.

2.7. PCR de colônia

Um total de 10 clones positivos foi utilizado para controle do tamanho dos fragmentos inseridos na transformação, por meio de uma reação de PCR usando-se o par de primers M13-F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') e M13-R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Cada reação foi feita para um volume final de 20µl contendo: 2,0 µl tampão KCl 10X (fermentas); 1,5 µl de MgCl₂ 25mM (fermentas); 0,4 µl de dNTPs 10mM (fermentas); 0,5µl do primer M13 F (5µM); 0,5µl do primer M13 R (5µM); 0,2µl da Taq DNA polimerase (5u/µl) (fermentas); 12,9 µl de H₂O Milli-Q e aproximadamente 1µl de cada colônia. As condições da reação foram: 95° C por 4 min; 95° C por 30s; 55° C por 30s; 72° C por 2min; 72° C por 7 min e 15° C forever, com 30 ciclos do passo 2 ao passo 4. Os produtos deste PCR foram resolvidos em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio.

2.8. Seqüenciamento dos clones ESTs

Os clones ESTs organizados em placas (96 poços) foram submetidos à extração do DNA plasmidial usando o método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) adaptado para placa. A qualidade e a quantidade dos plasmídios foram verificadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

A reação de seqüenciamento foi realizada com o Dyenamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit usando o primer *forward* M13-F 5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'. A reação foi efetuada nas seguintes condições: 40 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 1h e 20 min. Em seguida o DNA foi purificado adicionando-se 20 µL de isopropanol 65%, mantido a temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugado por 40 minutos a 4.000 rpm. O isopropanol foi removido invertendo-se a placa em papel toalha e imediatamente adicionando-se 100 µL de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a 4.000 rpm. O etanol foi removido invertendo-se a placa sobre papel toalha até secagem completa do álcool. O DNA foi ressuspendido em 7µl de Loading Solution (Formamida 70%, 1mM EDTA). Em 10 µL de formamida HiDI, desnaturado por 3 minutos a 95 °C, e colocado no gelo por cerca de 5 minutos. O seqüenciamento foi feito no seqüenciador capilar MegaBACE 1000 DNA Analysis system (Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA) no laboratório de genômica da UESC.

2.9. Processamento e anotação das ESTs

Os electroferogramas das sequências foram processados através de um *pipeline* manual seguindo as etapas seguintes: 1/ PHRED quality ≥ 10 com CROSS-MATCH *software* (EWING *et al.*, 1998); 2/ eliminação do vetor plasmidial; 3/ eliminação das extremidades poly A e poly T e dos adaptadores com Perl scripts. Após a limpeza, as sequências com tamanho superior a 90 pb foram selecionadas para montagem dos *contigs* e *singlets* utilizando-se o *software* CAP3. De posse dessas sequências todas elas foram analisadas contra Genbank de ESTs de fungos (Whitehead Fungal Prot e Pfam) usando a ferramenta Blast X. A anotação funcional das sequências com homologia foi realizada através da ferramenta Gene Ontology Categorizer (GOCat) disponível *online* em (<http://eagl.unige.ch/GOCat/>) que classifica a sequência pelo nome da proteína dentro das categorias do *Gene Ontology*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Construção da biblioteca de cDNA

O processo de extração com o RiboPure™ Kit (Ambion) foi eficiente, pois o RNA total extraído do micélio apresentou-se bastante íntegro e livre de DNA. A concentração foi de 70 ng/ μ l (Figura 2).

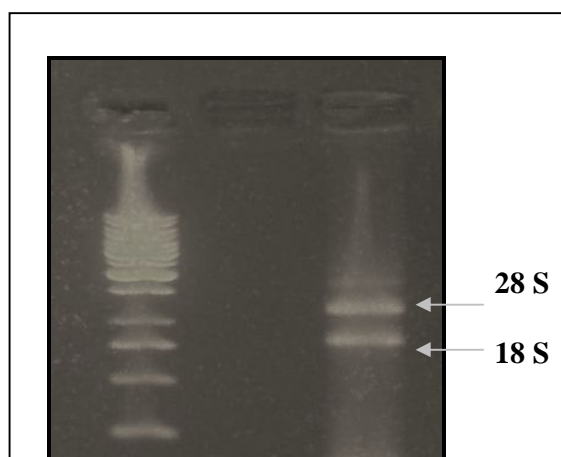


Figura 2. Gel de agarose a 1% com 5 μ l do RNA total, corado com brometo de etídio.

A integridade dos RNAs foi considerada como fator fundamental na construção da biblioteca, pois RNAs com degradação interferem na eficiência da síntese de cDNA. A 1ª fita foi sintetizada a partir de 3,0 µl do RNA total e foi utilizada para a síntese da 2ª fita. O volume total da 2ª fita foi fracionado em uma coluna CHROMA SPIN +TE 1000 (Clontech), para selecionar fragmentos de maior tamanho. Das 16 frações obtidas, três frações eleitas como sendo as de maior tamanho foram utilizadas para a ligação no vetor pTZ57R/T. A importância da seleção de fragmentos maiores reside no fato de que os fragmentos de menor tamanho competem com os de maior na reação de ligação ao vetor. Além disso, como parte do vetor é seqüenciada, na fase de processamento dos ESTs perde-se muito em termos de seqüência. Logo, fragmentos muito pequenos são pouco informativos, pois apresentam baixa similaridade com os bancos de dados.

A transformação com as células eletrocompetentes apresentou-se bastante eficiente e o resultado do PCR de colônias revelou que os fragmentos inseridos no vetor apresentavam tamanho entre 250 a 750 pb (Figura 3).

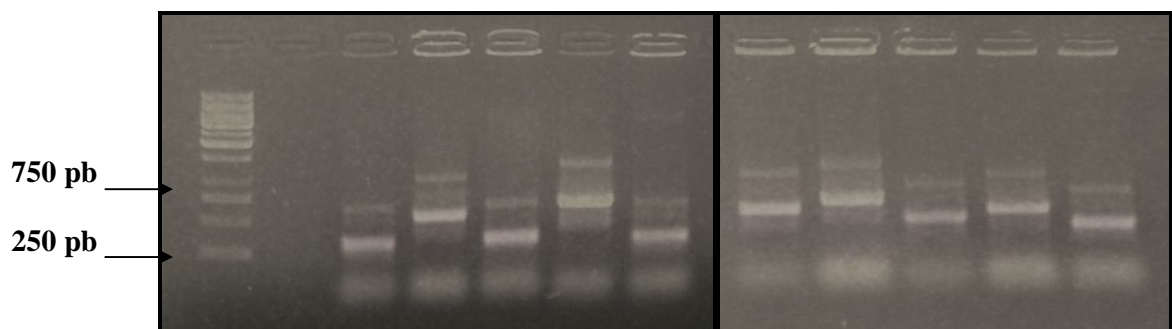


Figura 3. Amostra do PCR de colônias evidenciando a inserção dos fragmentos no vetor.

3.2. Sequenciamento, processamento e análise dos ESTs

Após a construção da biblioteca de cDNA um total de 1712 clones ESTs com tamanho médio de 341,1 pb foram seqüenciados, correspondendo 89,1% de sucesso no seqüenciamento. A partir da submissão das seqüências ao *pipeline* de análise um total de 585 ESTs (34% das seqüências) de qualidade (PHRED 10 e tamanho > 90 pb) foram gerados e analisados. As maiores perdas foram ligadas a qualidade do seqüenciamento (30% de seqüências com baixa qualidade) e a um grande número de seqüências (26%)

com tamanho inferior a 90 pb (Tabela 1). O tamanho médio dos ESTs após análise pelo *pipeline* foi de 230 pb. Os insertos desta biblioteca são relativamente pequenos a pesar de ter passado por uma etapa de enriquecimento em fragmentos longos (Figura 4). Esse resultado é contrastante comparado com a biblioteca de ESTs do fungo *Botrytis cinerea* cultivado em meio líquido, onde os tamanhos médios obtidos foram de 501 pb (Viaud *et al.*, 2005).

Após o agrupamento pelo CAP3, as ESTs de qualidade foram agrupadas em 54 *contigs* e 356 *singlets*. A maior parte dos *contigs* (55,5%) foi formado por dois ESTs, seguido dos *contigs* formados por 3 e por 4 ESTs (Figura 5).

Tabela 1. Número de sequências ESTs da biblioteca de cDNA de micélio de *M. ulei*. Os números revelam as perdas de ESTs após as etapas do processamento.

Nº de ESTs sequenciados	Nº de ESTs após PHRED 10	Nº de ESTs após Cross-Match	Nº de ESTs após eliminação pA e pT	Nº de ESTs ≥ 90 pb
1712	1208	1071	1036	585
	(-29.4%)	(-8%)	(-2%)	(-26.3%)

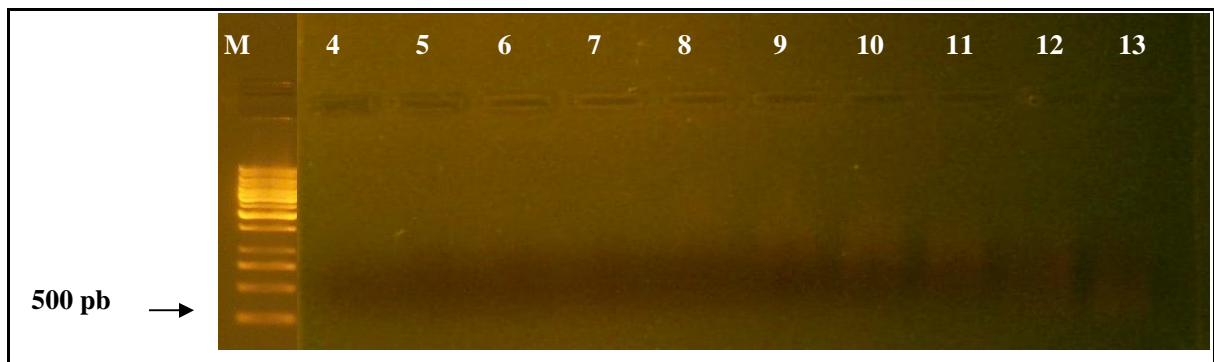


Figura 4. Perfil eletroforético das frações de cDNA obtidas a partir da eluição do extrato de cDNA na coluna ChromaSpin 1000 (Clontech). M: *ladder* 1kb. Os fragmentos de cDNA das frações 7, 8 e 9 contendo os maiores fragmentos foram agrupadas e clonados.

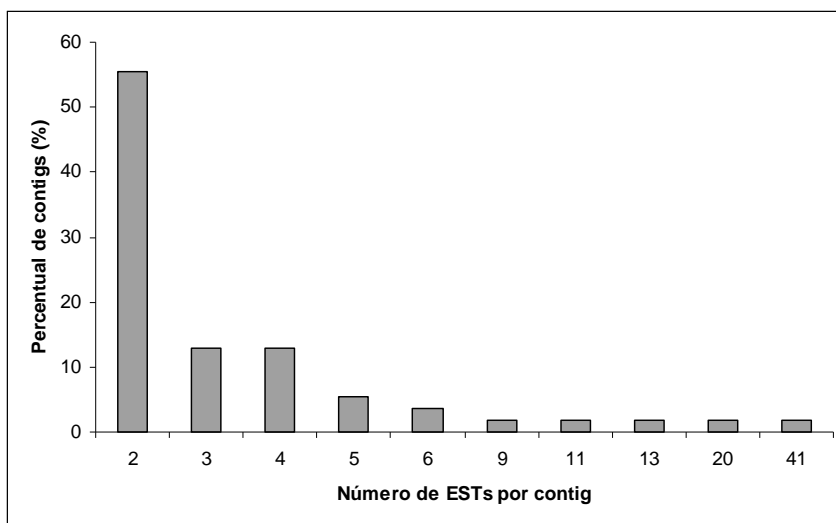


Figura 5. Histograma da distribuição percentual de ESTs por *contig*.

3.3. Anotação funcional

A análise de similaridade das ESTs de *M. ulei* foi realizada contra *Genbank* de ESTs de fungos (Whitehead Fungal Prot e Pfam) usando a ferramenta Blast X. Para 311 sequências não foi encontrado homologia de sequências. Para 54 sequências, foi encontrado similaridade com genes codificando proteínas com funções conhecidas e para 42 sequências foi encontrado homologia com genes codificando proteínas com funções desconhecidas. As ESTs que tiveram homologia foram submetidas à ferramenta Gene Ontology Categorizer (GOCat) para a classificação funcional das mesmas.

O processo de anotação, isto é, a busca por homologia com proteínas conhecidas visando identificar as prováveis funções dos ESTs, permitiu a caracterização funcional das mesmas em três diferentes níveis: (i) Processos biológicos; (ii) Função Molecular e (iii) Componente celular. A maioria dos clones anotados (50%) está relacionado ao nível função molecular, seguido do nível componente celular (35%) e processo biológico (15%), dentro desses níveis foi possível classificar os clones em 18 classes funcionais (Figura 6).

Os ESTs anotados envolveram um total de 8 vias metabólicas dentre as quais vale destacar : metabolismo de ácidos nucleicos; biosíntese de proteínas; metabolismo de lipídios; e biosíntese de melanina. O restante dos ESTs são genes codificando proteínas envolvidas em diferentes processos: protein binding; metabolismo de carboidrato/glicólise; metabolismo de etanol; ciclo de energia; ciclo do citrato; regulação de stress oxidativo; atividade catalítica; proteína de transporte; proteína de modificação

traducional; proteína de regulação; sinalização celular; estrutura celular; complexo de proteínas ribossomais e patogênese (Tabela 2).

Dentre os genes encontrados na biblioteca de micélio é importante ressaltar os genes: Ecp2 protein precursor e Laccase envolvidos no processo de patogênese. As proteínas extracelulares (ECPs) são secretadas por todas as linhagens de fungos. Duas dessas proteínas, ECP1 e ECP2 têm sido purificadas e seus genes codificadores isolados do fungo fitopatígeno de tomate *Cladosporium fulvum* (VAN DEN ACKERVEKEN, *et al.*, 1993). Estudos de expressão revelaram que ambos genes são altamente transcritos na colonização de folhas de tomate, indicando que estes genes possuem um papel chave na virulência deste fungo (WUBBEN, *et al.*, 1994). Laccase (benzenediol: oxygen oxidoreductase) é uma enzima que catalisa a oxidação de compostos fenólicos e não-fenólicos (BOURBONNAIS E PAICE, 1990). Em fungos a principal função da laccase está na ligninolise, ou seja, degradação de lignina (ARORA E GILL, 2000). Para alguns fungos de podridão branca a laccase está envolvida no processo de patogênese na planta, sendo considerada uma enzima de degradação de parede celular (GEIGER *et al.*, 1986).

O gene Glutathione S-transferase também encontrado na biblioteca é uma enzima de detoxificação encontrada principalmente no citoplasma. Segundo SHEEHAN *et al.*, (2001) esta enzima possui várias funções na célula, mais a principal é remover espécies de oxigênio reativos tendo atividades peroxidases e isomerases, elas podem inibir o N-terminal kinase protegendo as células contra H_2O_2 induzindo a morte celular. A expressão desse gene pelo fungo indica que o mesmo estava passando por algum tipo de estresse oxidativo na condição de crescimento *in vitro*.

Apesar de representar um número baixo de sequências, as ESTs identificadas neste trabalho podem servir de base para melhor compreensão do comportamento das vias metabólicas e dos processos biológicos de *Microcyclus ulei* cultivado em meio de cultura.

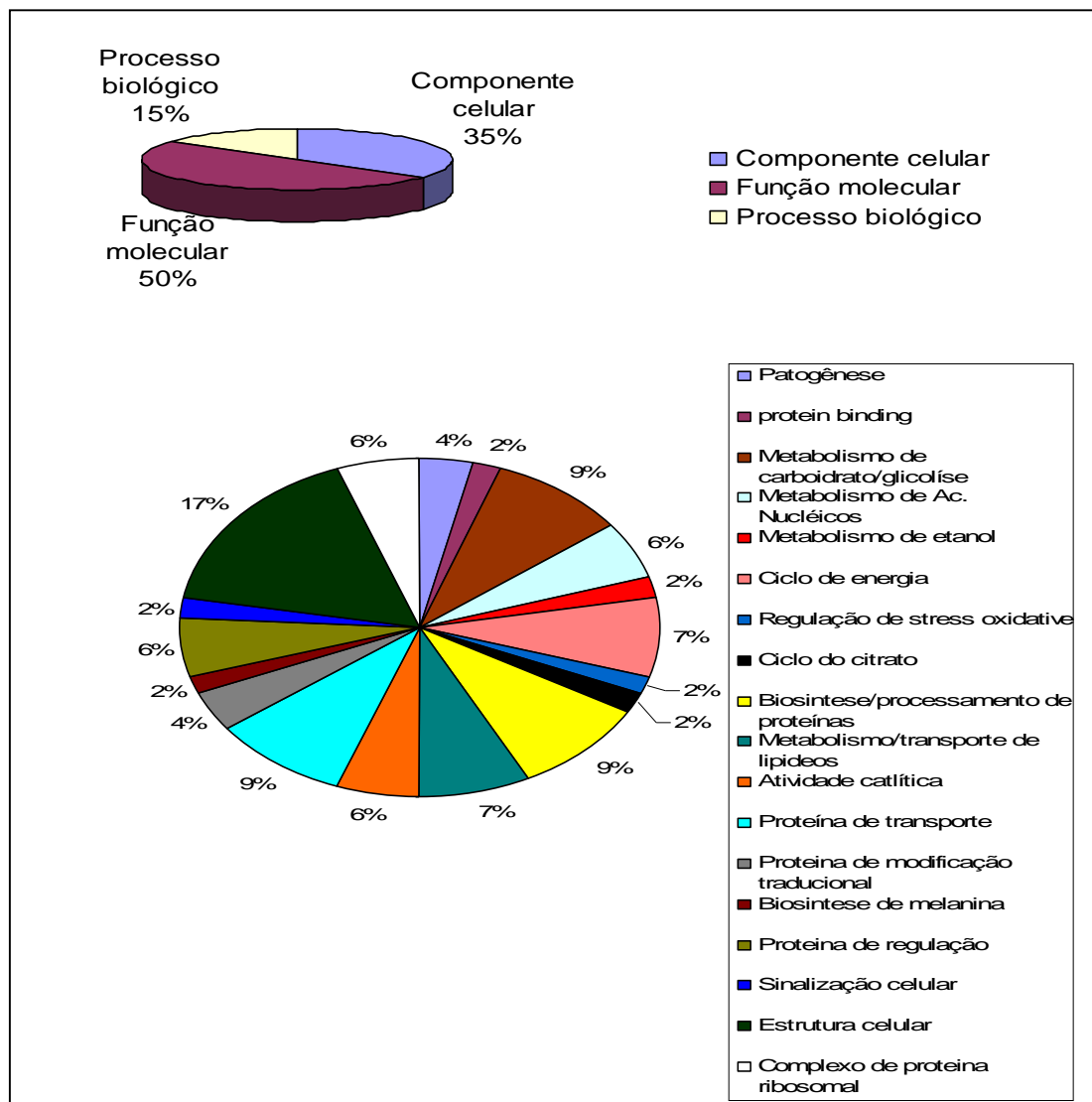


Figura 6. Gráficos exibindo o percentual das ESTs nas classes funcionais do GO.

Tabela 2. Lista dos ESTs de micélio de *Microcyclus ulei* com homologia de sequência.

Clone EST	Homologia	E-value
1- Patogênese		
Contig2	Ecp2 protein precursor	$9 e^{-10}$
Contig40	Laccase	$8e^{-19}$
2- protein binding		
Contig4	AMP-binding domain protein	$7e^{-27}$
3- Metabolismo de carboidrato/glicólise		
mu.my.m13f.pl22.E10	Enolase	$7e^{-11}$
Contig38	Phosphoglucomutase	$1e^{-24}$
Contig36	Epoxide hydrolase	$9e^{-5}$
mu.my.m13f.pl07.A05	mannosyl-oligosaccharide glucosidase	$7e^{-24}$
mu.my.m13f.pl08.E08	Glucose phosphomutase	$2e^{-28}$

4- Metabolismo de Ac. Nucléicos		
mu.my.m13f.pl22.G03	Ribonucleoside-diphosphate reductase large chain	3e ⁻¹⁵
mu.my.m13f.pl05.F10	snRNA-associated Sm-like protein LSm6	1e ⁻¹⁴
mu.my.m13f.pl21.B09	G-patch DNA repair protein (Drt111)	7e ⁻¹⁹
5- Metabolismo de etanol		
mu.my.m13f.pl11.E03	Alcohol dehydrogenase	6e ⁻³⁰
6- Ciclo de energia		
mu.my.m13f.pl11.A08	Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase	1e ⁻⁴⁷
mu.my.m13f.pl04.H10	NADH-ubiquinone oxidoreductase 105 kDa subunit	1e ⁻⁰⁸
mu.my.m13f.pl22.D04	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	2e ⁻⁰⁷
mu.my.m13f.pl15.F10	Mitochondrial 2-methylisocitrate lyase	8e ⁻¹⁴
7- Regulação de stress oxidative		
mu.my.m13f.pl06.E08	Glutathione S-transferase	2e ⁻¹¹
8- Ciclo do citrato		
mu.my.m13f.pl19.F04	ATP-citrate lyase	9e ⁻³⁴
9- Biosíntese/processamento de proteínas		
mu.my.m13f.pl20.C03	Zuotin and related molecular chaperones	1e ⁻¹³
mu.my.m13f.pl20.A03	Protein disulfide-isomerase precursor (translation)	5e ⁻³⁴
mu.my.m13f.pl17.G05	Aminopeptidase-P	1e ⁻²⁶
mu.my.m13f.pl17.D03	Anthranilate synthase component II	5e ⁻⁰⁵
mu.my.m13f.pl16.H06	Tryptophanyl-tRNA synthetase	2e ⁻⁵⁹
10- Metabolismo/transporte de lipídeos		
mu.my.m13f.pl19.B11	Peroxisomal long-chain acyl-CoA transporter	5e ⁻³⁸
mu.my.m13f.pl21.F05	3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase	2e ⁻²⁴
mu.my.m13f.pl20.E07	Fatty acid synthase subunit alpha reductase	3e ⁻¹¹
mu.my.m13f.pl19.B09	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase	1e ⁻⁰⁹
11- Atividade catlítica		
mu.my.m13f.pl14.D09	tubulin-tyrosine ligase	1e ⁻³³
Contig9	rRNA intron-encoded homing endonuclease (Fragment)	9e ⁻¹²
mu.my.m13f.pl10.G03	rRNA intron encoded homing endonuclease (translation)	1e ⁻⁰⁷
12- Proteína de transporte		
mu.my.m13f.pl22.D08	Scn1 protein	2e ⁻¹⁴
mu.my.m13f.pl05.F04	Coatomer alpha subunit	4e ⁻⁰⁷
mu.my.m13f.pl16.B11	Plasma membrane H+ATPase	1e ⁻⁰⁸
mu.my.m13f.pl20.H11	Protein transport protein SEC61 alpha subunit	1e ⁻²²
mu.my.m13f.pl05.E05	Protein similar to monosaccharide transporter	8e ⁻²⁵
13- Proteína de modificação traducional		
Contig23	Translation elongation factor EF-2 subunit	9e ⁻³¹
Contig5	Ubiquitin (306 nt)	5e ⁻⁴⁶
14- Biosíntese de melanina		
Contig44	Hydroxynaphthalene reductase	4e ⁻⁵⁷
15- Proteína de regulação		
mu.my.m13f.pl14.C09	Geranylgeranyl transferase alpha chain	9e ⁻¹⁶
mu.my.m13f.pl09.E06	protein-tyrosine-phosphatase	4e ⁻⁰⁹
mu.my.m13f.pl19.C05	rho GTPase activator Rgd1	1e ⁻³⁰
16- Sinalização celular		
Mu.my.m13f.pl13.C12	MAP kinase kinase skh1/pek1	3e ⁻¹⁴
17- Estrutura celular		

Contig8	ARP2/3 complex 34 kDa_subunit	2e ⁻⁵¹
mu.my.m13f.pl18.F05	Actin-related protein Arp2/3 complex	3e ⁻⁰⁷
mu.my.m13f.pl21.E12	Cell wall glucanase (Scw4)	4e ⁻⁰⁵
mu.my.m13f.pl22.C09	Cytochrome c-like protein	9e ⁻²⁹
mu.my.m13f.pl06.H05	Histone H2B-like protein	5e ⁻²⁹
mu.my.m13f.pl14.D04	G-protein-like protein	3e ⁻⁷¹
mu.my.m13f.pl06.H04	Yellowish-green 1-like protein	8e ⁻⁴²
Contig13	Protein TAR1	2e ⁻²⁰
mu.my.m13f.pl22.H08	Cell division protein FtsJ	4e ⁻²⁰
18- Complexo de proteína ribossomal		
Contig 26	40S ribosomal protein S3aE	5e ⁻⁴⁶
mu.my.m13f.pl12.C05	RIB40 genomic DNA	2e ⁻³³
mu.my.m13f.pl16.G03	40S ribosomal protein S9	1e ⁻²⁵
Contig 51	ribosomal-ubiquitin fusion protein (translation)	3e ⁻⁰⁵

4. CONCLUSÕES

- A biblioteca de cDNA teve um total de 1920 clones, destes 1721 foram sequenciados, os transcritos de *M. ulei* cultivados em meio BSA apresentaram sequências com um tamanho médio de 230 pb.
- As análises de bioinformática evidenciaram que 76% dos ESTs do set unigen não tiveram homologia com sequências de outros fungos, indicando que essas ESTs podem ser exclusivas do *M. ulei*.
- As ESTs que apresentaram homologia com o banco de dados pertencem a diferentes classes funcionais associadas à patogênese, metabolismo de carboidratos, metabolismo de aminoácidos, biosíntese de melanina, ciclo de energia dentre outras, as quais são de grande importância para elucidação de eventos fisiológicos que ocorrem durante o desenvolvimento micelial do fungo *in vitro*. Apesar de poucas, as ESTs identificadas neste trabalho servirão de base para melhor compreensão das vias metabólicas e dos processos biológicos de *Microcyclus ulei*.

CAPÍTULO 4

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES DERIVADOS DE ESTS DE MICÉLIO DE *Microcyclus ulei*

Autores: Leandro Araujo de Sousa, Julio Cezar Mattos Cascardo, Dominique Garcia

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES DERIVADOS DE ESTs DE MICÉLIO DE *Microcyclus ulei*

Leandro Araujo de Sousa, Julio Cezar Mattos Cascardo, Dominique Garcia

Resumo

O fungo ascomiceto *Microcyclus ulei* é um parasita obrigatório da seringueira (*Hevea sp.*), e agente patológico do Mal das folhas, doença endêmica da América Latina. Este fungo apresenta grande diversidade patológica, porém são poucas as informações sobre sua diversidade genética. Este trabalho teve por objetivo desenvolver marcadores microssatélites a partir de ESTs caracterizados de micélio cultivado *in vitro*. Três pares de primers foram testados na população de 23 isolados de *M. ulei*, sendo que um foi polimórfico. Os resultados mostraram que dos doze pares de primers desenhados, seis apresentaram produtos de amplificação. A partir destes resultados foi possível identificar regiões repetidas em sequências expressas de micélio de *M. ulei*. A principal classe de microssatélites encontrada no unigen foi de dinucleotídeos com duas repetições.

Abstract

The ascomycete fungus *Microcyclus ulei* is an obligate parasite of the rubber tree (*Hevea sp.*), and pathological agent from the leaves of evil, a disease endemic in Latin America. This fungus presents diverse pathological, however, little information about their genetic diversity. This study aimed to develop microsatellite markers from ESTs characterized from mycelium grown *in vitro*. Three pairs of primers were tested in a population of 23 isolates of *M. ulei*, and one was polymorphic. The results showed that the twelve pairs of primers, six showed amplification. A products from these results it was possible to identify expressed sequence repeat regions in the mycelium of *M. ulei*. The major class of microsatellites found in Unigen dinucleotides was with two repetitions.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as doenças da seringueira destaca-se como a mais importante a causada pela espécie fúngica *Microcyclus ulei*, agente etiológico do Mal das folhas. Esse fungo pode se apresentar nas formas teleomórfica e anamórfica simultaneamente em uma planta ou folha infectada, potencializando a taxa de recombinação gênica dentro das populações dos fungos, o que pode conduzir a uma rápida adaptação a mudanças nas condições do ambiente. Fatores como a natureza de dispersão do patógeno e a seleção

imposta pelo hospedeiro resistente, também podem influenciar a variabilidade encontrada nas populações dos patógenos (NAKYANZI, 2002).

Do ponto de vista evolutivo, a variabilidade genética das populações é importante por determinar o potencial de adaptação do organismo às condições adversas. Do ponto de vista epidemiológico, a variabilidade patogênica tem implicações diretas no manejo da doença (MC DONALD e LINDE, 2002). A existência de variabilidade nas populações de *M. ulei* poderá ter implicações no melhoramento para resistência ao Mal das folhas, especialmente na estabilidade e durabilidade da resistência.

Os níveis de variabilidade genética populacionais podem ser determinados por marcadores moleculares, como RAPD e AFLP usados em estudos de *fingerprinting*, e microssatélites utilizados em estudos de estrutura genética populacional (MEDEIROS *et al.*, 2006). O desenvolvimento de marcadores microssatélites pode auxiliar nos estudos de variabilidade genética do *M. ulei* e compatibilidade entre raças. Recentemente, Le Guen *et al.* (2004) desenvolveram a partir de DNA genômico marcadores microssatélites polimorfos para *M. ulei*, abrindo novas perspectivas de pesquisa sobre o estudo da diversidade desse microrganismo.

Microssatélites ou *simple sequence repeats* (SSRs) são marcadores moleculares que consistem de repetições em *tandem* de um a seis pares de base de DNA. São marcadores altamente versáteis, normalmente associados com uma alta frequência de polimorfismo (ZHAN *et al.*, 2005). Apesar do estudo que mostrou a eficiência dos SSR em *M. ulei* (LE GUEN *et al.* 2004) ainda não se dispõem de dados de SSR obtidos a partir de sequências expressas. Essa abordagem já foi desenvolvida para outros fungos patogênicos como endófitos *Neotyphodium* (VAN ZIJLL de JONG *et al.*, 2003) e *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (LENG, *et al.*, 2009).

Pelo fato de pouco se conhecer sobre a variabilidade genética das populações de *M. ulei* ocorrente nas regiões de cultivo do Brasil, objetivou-se analisar a variabilidade genética existente entre isolados de *M. ulei* coletados em diferentes localidades de quatro Estados brasileiros (AM, BA, ES, MG) mediante a técnica de EST-SSR.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos isolados

Amostras de micélio de 11 cepas monoconídios de *M. ulei* cultivadas em meio BSA (MC6) proposto por Junqueira *et al.* (1984) proveniente da micoteca do Laboratório

de fitopatologia da Plantação Michelin da Bahia (Ituberá, BA) foram conservadas a 24 °C até o momento da extração do DNA. Além dos isolados da plantação Michelin da Bahia, foram analisadas outras 19 amostras de DNA extraídas de isolados coletados na Bahia (Una, Porto Seguro), Espírito Santo, Mato Grosso e Amazônia (Tabela 1).

Tabela 1. Localização geográfica e origem dos isolados de *M. ulei* utilizados na caracterização dos microssatélites.

Cepa	Cultivar de origem	Nível de virulência*	Local	Abreviação
FTP 07	TP 875	7	Plantação Michelin Bahia / Igrapiúna/BA/Br	BA / PMB
FTP 20 <i>M1</i>	FX 3864	6	Plantação Michelin Bahia / Igrapiúna/BA/Br	BA / PMB
PMB 26 <i>M1</i>	FDR 5788	8	Plantação Michelin Bahia / Igrapiúna/BA/Br	BA / PMB
PMB 94 <i>M1</i>	FX 3864	5	Plantação Michelin Bahia / Igrapiúna/BA/Br	BA / PMB
Mu 110 BA <i>M1</i>	FDR 5788	n.d.	Fazenda Piruna/Una/BA/Br	BA / UNA
Mu 111 BA <i>M1</i>	FDR 5788	n.d.	Fazenda Piruna/Una/BA/Br	BA / UNA
Mu 112 BA <i>M1</i>	IAN 717	n.d.	Fazenda Piruna/Una/BA/Br	BA / UNA
Mu 113 BA <i>M1</i>	IAN 717	n.d.	Fazenda Piruna/Una/BA/Br	BA / UNA
Mu 65 BA <i>M1</i>	FX 25	n.d.	Fazenda Batalha/Porto Seguro/BA/Br	BA / PS
Mu 69 BA <i>M1</i>	RRIM 600	n.d.	Fazenda Macadânia/Porto Seguro/BA/Br	BA / PS
Mu 70 BA <i>M1</i>	RRIM 600	n.d.	Fazenda Macadânia/Porto Seguro/BA/Br	BA / PS
Mu 76 BA <i>M1</i>	RRIM 600	n.d.	Fazenda Macadânia/Porto Seguro/BA/Br	BA / PS
Mu 01 ES	FX 3864	n.d.	Guarapari/ES/Br	ES
Mu 02 ES	FX 3864	n.d.	Guarapari/ES/Br	ES
Mu 03 ES	FX 3864	n.d.	Guarapari/ES/Br	ES
Mu 04 ES	FX 3864	n.d.	Guarapari/ES/Br	ES
Mu 15 MT	PB 312	n.d.	Itiquira/MT/Br	MT
Mu 27 MT	RRIM 908	n.d.	Itiquira/MT/Br	MT
Mu 29 MT	RRIM 809	n.d.	Itiquira/MT/Br	MT
Mu 38 MT	PB 350	n.d.	Itiquira/MT/Br	MT
Mu 06 AM	FX 3864	n.d.	EMBRAPA/Manaus/AM/Br	AM
Mu 08 AM	FX 3864	n.d.	EMBRAPA/Manaus/AM/Br	AM
Mu 09 AM	FX 3864	n.d.	EMBRAPA/Manaus/AM/Br	AM

* Nível de virulência dos isolados baseado nas anotações do tipo de reação segundo a escala de Mattos *et al.* (2003) numa gama de 11 cultivares de seringueira; *M*: isolamento monospórico; n.d.: não determinado.

2.2. Extração de DNA

O DNA genômico total foi extraído a partir de micélio fresco, de acordo com o método CTAB modificado (Richards *et al.*, 1994). Aproximadamente 1g de tecido foram maceradas em nitrogênio líquido e depois homogeneizadas em 0,8ml do tampão de extração (2% CTAB, 20 mM EDTA, PVP 1%, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.0 e β -

mercaptoetanol 0,2%) e incubadas à 65° C durante 40 minutos. A essa mistura foi adicionado 0,8ml de (clorofórmio: álcoolisoamílico 24:1) que foi misturada por inversão durante 5min e centrifugado por 5 min a 13.400 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e novamente foi adicionado 0,8ml de (clorofórmio:álcoolisoamílico 24:1) e misturado por inversão durante 5 min e centrifugado por 5 min a 13.400 rpm. A fase superior foi transferida para um novo tubo e submetida à precipitação com 0,6V de isopropanol de um dia para o outro. Após esse período as amostras foram centrifugadas por 15 min e o *pellet* formado foi lavado com etanol 70%. As amostras foram ressuspendidas em 50 µL de TE (Tris EDTA 10X) e mantidas a temperatura ambiente por 24 h para degradação do RNA. Para avaliar a qualidade do DNA, alíquotas de 2 µL das amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,5mg/mL). A concentração do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm.

2.3. Identificação das seqüências SSR nos ESTs e desenho dos primers

A busca por seqüências microssatélites (SSR) nos ESTs da biblioteca de cDNA de micélio, descrita no capítulo anterior foi realizada através da ferramenta SSRIT, *Simple Sequence Repeat Identification Tool* (TEMNYKH *et al.*, 2001). As repetições encontradas em cada uma das seqüências foram utilizadas para seleção dos ESTs e desenho de *primers* microssatélites. Os microssatélites selecionados para amplificação foram aqueles que atenderam a dois critérios na seguinte ordem: (i) maior número de repetições e (ii) e menor unidade de repetição, de forma a possibilitar a detecção de polimorfismo em gel de acrilamida. Os microssatélites foram selecionados baseados principalmente no número de repetições. Os *primers* foram desenhados utilizando o *software* PRIMER Designer versão 2.0.

2.4. Reação de PCR

As reações de PCR foram realizadas da seguinte maneira: 2,0 µL tampão KCl 10X (fermentas); 1,6 µL de MgCl₂ 25mM (Fermentas); 1,6 µL de dNTPs 2,5mM (Fermentas); 0,8 µL de primer F (5µM); 0,8 µL de primer R (5µM); 0,2 µL da Taq DNA polimerase (5u/µL) (Fermentas); 11 µL de H₂O Milli-Q e 20 ng de DNA molde, completando um volume final de 20 µL. As condições das reações foram: 95° C por 4 min; 30 ciclos de 95° C por 30s; a temperatura de anelamento foi variável dependendo dos iniciadores como

indicado na tabela 5 (30s); 72° C por 2min e mais 72° C por 5 min; 15° C *for ever*. As reações foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycler em placas Os productos de PCR foram observados em gel de agarose (3%) adicionado de Brometo de Etídio (0,5mg/mL).

2.5. Resolução dos produtos de PCR e análise do polimorfismo

Os produtos de PCR que apresentaram amplificação foram submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida de alta resolução desnaturante 6%, corado com nitrato de prata segundo o protocolo de Creste et al., (2000). O tamanho dos alelos foi estimado por comparação com o ladder de 10 pb DNA Ladder (Invitrogen).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O programa SSRIT possibilitou identificar ao todo 5447 unidades de repetição SSRs dentro do Unigene distribuídas entre di, tri, tetra, penta, hexa, hepta, octa, nona e decanucleotídeos com maior abundância dos dinucleotídeos (60%) e trinucleotídeos (28%) a maioria com duas repetições (Figura 18).

Em uma análise no ESTs *database* com 5800 genes de *Phytophthora sojae* foi identificado 415 SSR em 369 ESTs utilizando a mesma ferramenta (SSRIT), o motivo mais freqüente foi repetições de trinucleotídeos (ZHU, *et al.*, 2004). Dracatos *et al.*,(2006) desenvolveu e caracterizou marcadores EST-SSR a partir de uma biblioteca de cDNA derivada de uredíniosporos de *Puccinia coronata* um fungo biotrófico obrigatório causador da ferrugem marrom do capim. Neste trabalho, o autor obteve 1100 EST e dentre estas 55 foram identificadas como locus SSR, a maioria dos microsatélites foram trinucleotídeos perfeitos com baixo número de repetições. Os motivos mais comumente representados foram (ACC)_n e (CAT)_n. Um importante aspecto a ser observado é o baixo índice de variação nas regiões codificadoras do DNA, pois estas são regiões são mais conservadas do que as regiões não codificantes, o que explica o pouco polimorfismo nos microsatélites provenientes de ESTs (CHO *et al.*, 2000).

Com base nesses resultados, a freqüência das diferentes classes de microsatélites diminui à medida que aumenta o tamanho da unidade repetitiva, ou seja, quanto maior o número de nucleotídeos na unidade repetitiva do SSR, menor é a sua freqüência dentro do genoma do fungo (Figura 1).

De acordo com os critérios de seleção definidos: maior número de repetições e maior abundância nos ESTs analisados foram selecionadas 25 sequências microssatélites, e desenhados 12 pares de primers (Tabela 2). A maioria das sequências não foram aproveitadas para o desenho dos primers, devido os microssatélites se encontrarem na região inicial ou final da sequência EST analisada.

Trabalhando com micélio de fungo, tecido haplóide, espera-se obter para cada isolado uma banda única por locus SSR (Figuras 19, 20 e 21). Apesar de não ter-se trabalhado somente com isolados monoconídio (isolados da Bahia), mas também com isolados monolesão (isolados de Espírito Santo, Mato Grosso e Amazônia), não foi encontrado nas amostras testadas um padrão de banda dialélico que indicaria que o isolado seria constituído de mais de um tipo genético.

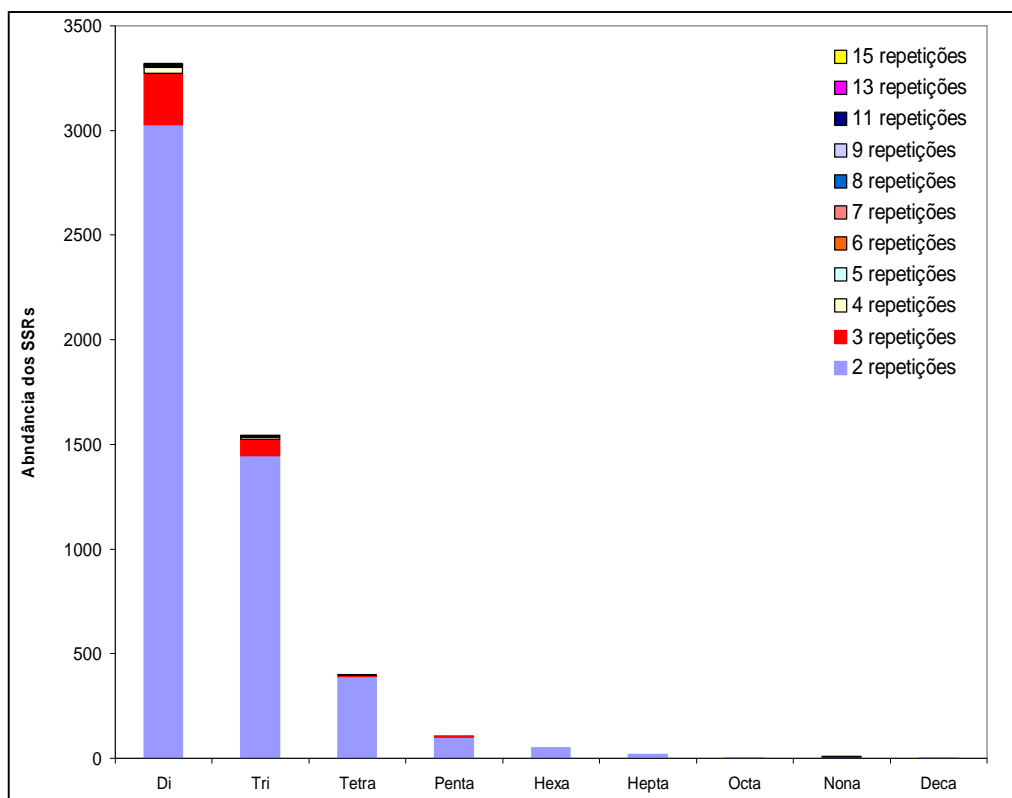


Figura 1. Classes de SSR encontrada na biblioteca de cDNA de *M. ulei*.

Seis dos doze primers desenhados permitiram obter produtos de amplificação, porém apenas o primer Mu-SSR7 apresentou polimorfismo entre os indivíduos (Figura 2). O tamanho em pb dos produtos de amplificação estão descritos no Anexo A. Uma das

limitações da técnica de separação em gel de acrilamida é o baixo poder de separação quando se trata de detectar variação de poucos nucleotídeos (2 a 4 pb). No primeiro estudo de Le Guen *et al.* (2004) que desenvolveu marcadores SSR em *M. ulei*, nota-se que para os 11 pares de primers desenvolvidos mais da metade apresentava variação de 2 e 4 pb. Talvez a detecção do polimorfismo baseado em marcação com fluorocromo seria uma alternativa para se detectar essas pequenas variações.

Diante dos resultados obtidos faz-se necessário aumentar o número de padrões eletroforéticos e incrementar a população estudada visando estabelecer melhor as relações de parentesco entre os isolados.

Tabela 2. Sequências dos iniciadores, condições de PCR e polimorfismo observado para 12 locus em *Microcyclus ulei*.

Locus	Referência na biblioteca EST	Função EST	Sequência dos iniciadores	Motivo repetido	Tamanho (pb)	T _a (°C)	Amplificação (+ ou -)	Número de alelos					
								BA/PMB	BA/UNA	BA/PS	ES	MT	AM
Mu-SSR1.4	mu.my.pl04.A12	No hit	F: 5'-CGAATACGCTCATGCAGAAC-3' R: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAG-3'	(CAT) ₁₀ (CCT) ₃	113	51	-						
Mu-SSR2.3	mu.my.pl04.B09	No hit	F: 5'-ATCAACGCAGAGTAGCCA-3' R: 5'-AGGTGAAGCGTTGTACGA-3'	(GTC) ₅	118	51	-						
Mu-SSR4.2	mu.my.pl06.E06	No hit	F: 5'-GTCGCTACGCTATGCAGTAT-3' R: 5'-GTGGATGTCATGGTAGATGG-3'	(GAC) ₅	92	50-60	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mu-SSR5.5	mu.my.pl06.H09	No hit	F: 5'-GTATGGGATGGTCACGTCAA-3' R: 5'-AGCAGTGGTATCAACGCAGA-3'	(TC) ₂ G (CT) ₁₁	175	55	-						
Mu-SSR6.3	mu.my.pl07.H12	No hit	F: 5'-CTCCAAGACGGTCGTGTTCA-3' R: 5'-CAGCATATCTCGCAGCCGTA-3'	(TA) ₇ (TC) ₆	91	50-60	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mu-SSR7.0	mu.my.pl22.B03 contig49	No hit	F: 5'-TTGCAGACAGACACACACAC-3' R: 5'-CCGAGTCGTGCATGCTTA-3'	(AC) ₉ ATA (AC) ₄	70 - 76	50	+	2	1	1	1	1	1
Mu-SSR8.0	mu.my.pl10.E03	No hit	F: 5'-AAGTCGATCTGGCGAG-3' R: 5'-CTAACTGCATCTTGACC-3'	(GA) ₉	82	50	+	1	1	1	1	1	1
Mu-SSR9.0	mu.my.pl06.H09	No hit	F: 5'-GAATTGTCGCGAGGCT-3' R: 5'-TGTGCTCTCGCTCTCTCT-3'	(GA) ₁₁	70	50	+	1	1	1	1	1	1
Mu-SSR10	mu.my.pl12.C07	No hit	F: 5'-CATGTGCGACGACGAA-3' R: 5'-GGTCGATGACAGGAGTGATA-3'	(GT) ₁₁	64	47	-						
Mu-SSR11	mu.my.pl14.F11	No hit	F: 5'-GCCTGATGGTGATGAA-3' R: 5'-CCGCTCTGTCTTCTTC-3'	(GAA) ₇	44	49-59	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mu-SSR12	mu.my.pl22.C04	No hit	F: 5'-GTGGATGGATGGATGG-3' R: 5'-ATGCACACGACGACCT-3'	(TGGA) ₈	98	50	-						
Mu-SSR13	mu.my.pl20.E09	No hit	F: 5'-GGAGAAGATGGAGAAGATGG-3' R: 5'-TTGTCTACGAGTCGAGAAGC-3'	(GGAGAAGAT) ₂ GGAGAGA (GGAGAAGAT) ₂ GGAGAGA (GGAGAAGAT) ₂	165	53	-						

T_a : temperatura de anelamento. n.d.: não determinado

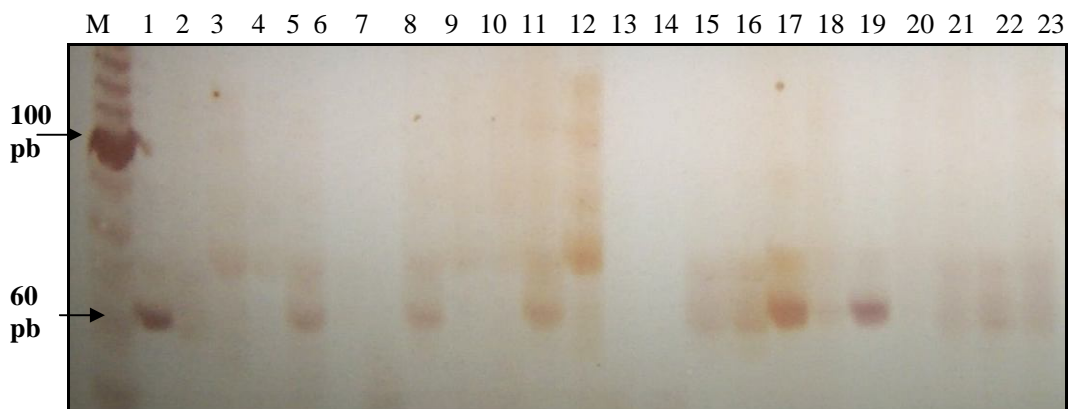


Figura 2. Perfil eletroforético dos produtos amplificados com o par de primers microssatélites Mu-SSR7, separados em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com prata. M: marcador, 1:FTP7; 2:FTP20; 3: PMB26; 4:PMB94; 5:Mu65 BA; 6:Mu69 BA; 7:Mu70 BA; 8:Mu76 BA; 9: Mu110 BA; 10: Mu111 BA; 11:Mu112 BA; 12:Mu113 BA; 13:Mu01 ES; 14:Mu02 ES; 15:Mu03 ES; 16:Mu04 ES; 17:Mu15 MT; 18:Mu27 MT; 19:Mu29 MT; 20:Mu38 MT; 21:Mu06 AM; 22:Mu08 AM; 23:Mu09 AM.

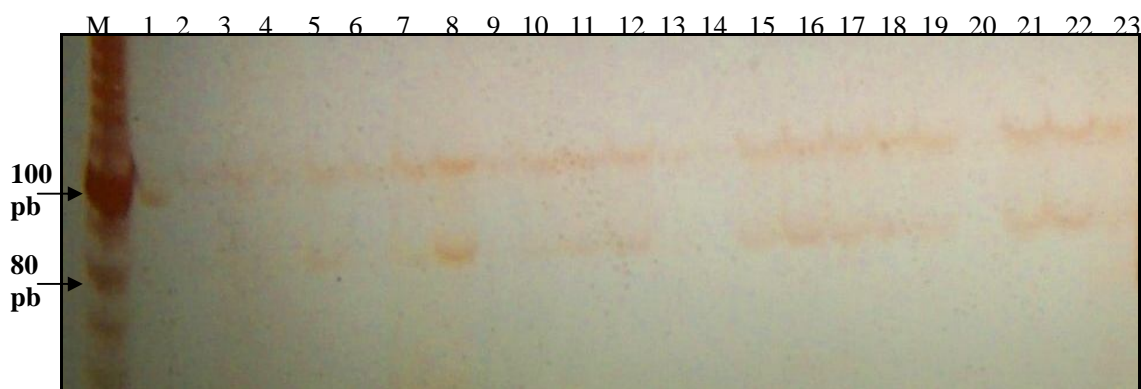


Figura 3. Perfil eletroforético dos produtos amplificados com o par de primers microssatélites Mu-SSR8, separados em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com prata. M: marcador, 1:FTP7; 2:FTP20; 3: PMB26; 4:PMB94; 5:Mu65 BA; 6:Mu69 BA; 7:Mu70 BA; 8:Mu76 BA; 9: Mu110 BA; 10: Mu111 BA; 11:Mu112 BA; 12:Mu113 BA; 13:Mu01 ES; 14:Mu02 ES; 15:Mu03 ES; 16:Mu04 ES; 17:Mu15 MT; 18:Mu27 MT; 19:Mu29 MT; 20:Mu38 MT; 21:Mu06 AM; 22:Mu08 AM; 23:Mu09 AM.

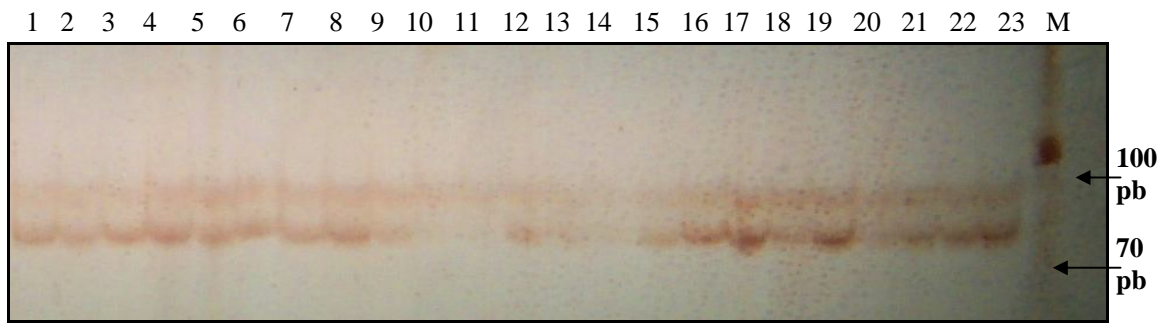


Figura 4. Perfil eletroforético dos produtos amplificados com o par de primers microssatélites Mu-SSR9, separados em gel de poliacrilamida desnaturante 6% e visualizados por meio de coloração com prata. M: marcador, 1:FTP7; 2:FTP20; 3: PMB26; 4:PMB94; 5:Mu65 BA; 6:Mu69 BA; 7:Mu70 BA; 8:Mu76 BA; 9: Mu110 BA; 10: Mu111 BA; 11:Mu112 BA; 12:Mu113 BA; 13:Mu01 ES; 14:Mu02 ES; 15:Mu03 ES; 16:Mu04 ES; 17:Mu15 MT; 18:Mu27 MT; 19:Mu29 MT; 20:Mu38 MT; 21:Mu06 AM; 22:Mu08 AM; 23:Mu09 AM.

4. CONCLUSÕES

- A principal classe de microssatélites encontrada no unigen foi de dinucleotídeos com duas repetições.
- Foi possível identificar regiões repetidas em sequências expressas de micélio de *M. ulei*
- Dos doze pares de iniciadores definidos, seis deram produtos de amplificação. Dos três pares de iniciadores que foram testados na população de 23 isolados de *M. ulei*, um foi polimórfico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, M. D.; Kelley, J. M.; Gocayne, J. D.; Dubnick, M. *et al.* (1991) **Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project.** *Science*. 252: 1651-1656.

AGRIANUAL 2006. **Anuário da Agricultura Brasileira.** Seringueira. AGRA FNP. 2006.

Alfenas, A. C. e Mafia, R. G. **Métodos em Fitopatologia.** Viçosa: Ed. UFV, 2007.

Andrade S.J.; Carels N., Sousa L.A.; Cardoso, S; Rodrigues A.C.S., Dias R.J.C., Gesteira A.S. Micheli F., Cascardo J.C.M., Garcia D. (2007) **Análises bioinformáticas de ESTs oriundos de uma interação compatível entre *Hevea brasilienses* e *Microcyclus ulei*.** 53º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia (SP). GP229.

Arora, D. S. e Gill, P. K. (2000) **Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions.** *Bioresource Technology* 73, 283-285.

Barbosa, C. C.; Monteiro, A. C.; Correia, A. C. B.; Pereira, G. T. (2002) **Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes condições nutricionais.** *Pesq. agropec. bras.* 37: 821-829.

Black, G. Jacquelyn. Tradução Eiler Fritsch Toros. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas.** 4ª edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro: 2002.

Bergamin, A. F.; Kimati, H.; Amorim, L.. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos.** Vol. 1 3ª edição. Editora Agronômica Ceres: São Paulo, 1995.

Bourbonnais, R., Paice, M.G., (1990) **Oxidation of non-phenolic substrates an expanded role for laccase in lignin biodegradation.** *FEBS Lett.* 267, 99 -102.

Bridge, P. D.; Arora, D. K. (1998) **Interpretation of PCR methods for species definition.** In: BRIDGE, P.; ARORA, D. K.; REDDY, C. A.; ELANDER, R. P. (Ed.). *Applications of PCR in mycology.* London: CAB International, p.63-84.

Brondani C.; Brondani, R. P. V. Garrido, L. R. and Ferreira M. E. (2000) **Development of microsatellite markers for the genetic analysis of *Magnaporthe grisea*.** *Genetics and Molecular Biology*, 23, 4, 753-762.

Borém, Aluizio e Caixeta, Eveline Teixeira. **Marcadores Moleculares.** Editora Folha de Viçosa. Viçosa – MG: 2009.

Dezwaan, T.M., Carroll, A.M., Valent, B. and Sweigard, J.A. (1999) ***Magnaporthe grisea* pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues.** *Plant Cell*, 11, 2013–2030.

Dracatos, Peter M.; Dumsday, Jeremy L.; Olle Rhiannon S. *et al.* (2006) **Development and characterization of EST-SSR marker for the crown rust pathogen of ryegrass (*Puccinia coronata f.sp. lolii*).** *Genome* 49: 572-583.

BRASIL, SUDHEVEA. **Plano Nacional de Borracha. Pesquisas Fitopatológicas. In: Pesquisa e experimentação realizados com a seringueira.** Rio de Janeiro. 1971. p. 36-107.

Cardoso, J.E.; Wilkinson, M.J. (2008) **Development and characterisation of microsatellite markers for the fungus *Lasiodiplodia theobromae*.** *Summa Phytopathologica*, v.34, n.1, p.55-57.

Carlile, M.J.; Watkinson, S.C. **The fungi.** San Diego: Academic, 1994. 428p.

Chee, K.H. (1976) **South American Leaf Blight of *Hevea brasiliensis*: spore dispersal of *Microcyclus ulei*.** *Annals of Applied Biology*. v.84, n. 2, p. 147-152.

Chee, K.H. (1978) **South American Leaf Blight *Hevea brasiliensis*: Culture of *Microcyclus ulei*.** *Trans. Br. Mycol. Soc.* 70(3): 341.

Chee, K. H.; Holliday, H. (1986) **South American leaf blight of rubber.** Kuala Lumpur: *Malaysian Rubber Research Development Board*, 50p.

Chee, K.H.; Zhang, K.M.; Darmono, T.W. (1986) **The Occurrence of Eight Races of *Microcyclus ulei* on Hevea Rubber in Bahia, Brasil.** *Trans, Br. Mycol. Soc.* 87, 15.

Cho, Y.G.; ISHII, T.; Temnykh, S.; Chen, X.; Lipovich, L.; McCouch, S.R.; Park, W.D.; Ayres, N.; Cartinhour, S. (2000) **Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.).** *Theoretical and Applied Genetics*. 100: 713-722.

Choi, W. and Dean, R.A. (1997) **The adenylate cyclase gene *MAC1* of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development.** *Plant Cell*, 9, 1973–1983

Franco, G. **Tabela de composição química dos alimentos.** São Paulo: Editora Atheneu, 1998.

Furtado, E.L. & Trindade, D.R. **Doenças da seringueira (*Hevea* spp.).** In Kimate, H., Amorim, L. Rezende, JAM., Bergamim Filho, A. & Camargo, L.E.A. **Manual de fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas.** São Paulo. Agronômica Ceres. 2005

Garcia, C.A.B. & Jesus, N.S. **Teor mineral da água de coco.** 47° Congresso Brasileiro de Química (2007). Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/4/4-16-80.htm>>. Acesso em: 05 de Março 2010.

Gasparotto, L.; Zambolim, L.; Ribeiro do Vale, F. X. Maffia, L. A. Junqueira, N. T. V. (1989) **Epidemiologia do mal das folhas da seringueira.** *Fitopatologia Brasileira*. Ponte Nova-MG. v.14, n.1, p.65-70.

Gasparotto, L.; Junqueira, N.T.V.; Maffia, L.A.; Ribeiro, F.X. (1991) **Epidemiology of south American leaf blight of rubber tree. II- Manaus region – AM.** *Fitopatologia Brasileira*. 18: 22-24.

- Gasparotto, L.; Lieberei, R.; Trindade, D. (1984) **In vitro conidia germination of *Microcyclus ulei* and its sensitivity to fungicides.** Fitopatologia Brasileira. 9: 505-511.
- Gasparotto, Luadir; Santos, Álvaro F.; Pereira, José C. R.; Ferreira, F.A. **Doenças da seringueira no Brasil.** Brasília: Embrapa – SPI. Manaus: Embrapa – CPAA, 1997.
- Geiger, J.P., Nicole, M., Nandris, D., Rio, B., (1986) **Root rot diseases of *Hevea brasiliensis* I. Physiological and biochemical aspects of root aggression.** *Eur. J. For. Pathol.* 16, 22±37.
- Gonçalves, P. de S.; Paiva, J. R.; Souza, R. A. **Retrospectiva e atualidade do melhoramento genético da seringueira (*Hevea spp*) no Brasil e em países asiáticos.** Manaus: Embrapa-CNPQ, 1983. 69p.
- Gramacho K P; Risterued A. M.; Lima L. S. et al. (2007) **Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen *Crinipellis pernicios*.** *Molecular Ecology Notes*, 7: 153-155.
- Griffiths, F.; Gelbart, W. M.; Miller, J. H.; Lewontin, R. C. **Genética Moderna.** Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro: 2001.
- Hamada, H.; Petrino, M. G.; Kakunaga, T. A. (1982) **A novel repeat element with Z-DNAforming potential is widely found in evolutionary diverse eucariotic genomes.** *Proceedings National Academy Science United States America, Washington*, v. 79, p.6465-6469.,
- Hashim, L. and Almeida, L.C.C. de (1987). **Identification of races and in vitro sporulation of *Microcyclus ulei*.** *Journal of Natural Rubber Research*, 2(2): 111-117.
- Holliday, P. **South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) of *Hevea brasiliensis*** (1970) C.M.I. *Phytopatological Papers*. Nº 12, p. 1-31.
- Idnurm, A. and Howlett, B.J. (2001) **Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi.** *Mol. Plant Pathol.* 2, 241–255.
- Junqueira N.T.V., Chaves G.M., Zambolin L., Romeiro R.S. and Gasparotto L. (1984) **Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico de Mal-das-folhas da seringueira.** *Revista Ceres*. 31: 322-331.
- Junqueira N.T.V.; Chaves G.M.; Zambolin L.; Gasparotto L.; Alfenas A.C. (1986) **Variabilidade fisiológica de *Microcyclus ulei*.** *Fitopatologia Brasileira*. 11: 823-833.
- Junqueira N.T.V.; Alfenas, A. C.; Chaves, G.M.; Zambolin L.; Gasparotto L. (1987) **Variabilidade isoenzimática de isolados de *Microcyclus ulei* com diferentes níveis de virulência.** *Fitopatologia Brasileira*. 12(3), 208-214.
- Junqueira N.T.V.; Chaves G.M.; Zambolin L.; Gasparotto L.; Alfenas A.C. (1988) **Reação de clones de seringueira a vários isolados de *Microcyclus ulei*.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília: v.23, n.8, p. 877-893.

- Langdon, K.R. (1965). **Relative resistance or susceptibility of several clones of *Hevea brasiliensis* and *H. brasiliensis* x *H. benthamiana* to two races of *Dothiedella ulei*.** *Plant Disease Report*. 49: 12-14.
- Langford, M. H. **South American leaf blight of *Hevea* rubber trees.** Washington, D. C.: USDA Technical Bulletin, 882. 1945. 31p.
- Le Guen V., Rodier-Goud M., Troispoux V., Xiong T.-C., Brottier P., Billot C. and Seguin M. (2004) **Characterization of polymorphic microsatellite markers for *Microcyclus ulei*, causal agent of South American leaf blight of rubber trees.** *Molecular Ecology*. 4: 122-124.
- Leal-Bertioli, S. C. de M. (1998) **O enfoque molecular na sistemática de fungos.** Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v.6, p.197-230.
- Lieberei, R.; Schrader, A.; Biehl, B. Chee, K. H. (1983) **Effect of cyanide on *Microcyclus ulei* cultures.** *Journal of the Rubber reserarch Institute of Malaysia*, v.31 n.3, p. 227-235.
- Lieberei, R. (2007). **South American Leaf Blight of the Rubber Tree (*Hevea* spp.): New Steps in Plant Domestication using Physiological Features and Molecular Markers.** Oxford Journals. *Annals of Botany* 1–18.
- Lima, Denis Ubada de; Oliveira, Luiz Edson Mota de; Soares, Ângela Maria; Delú-Filho, Nelson. (2002) **Avaliação sazonal da produção de borracha e da dinâmica de carboidratos solúveis em plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) cultivadas em Lavras, Minas Gerais.** Sociedade de Investigações Florestais. Viçosa-MG, 26:377-383.
- Liu, S. and Dean, R.A. (1997) **G protein α subunit genes control growth, development, and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*.** *Mol. Plant–Microbe Interact.* 10, 1075–1086.
- Litt, M.; Luty, J. A. (1989) **A hipervariable microsatelite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotídeo repeat within the cardiac muscle actin gene.** *American Journal of Humans Genetics*, v. 44, p. 398-401.
- Lorenzil, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa: Ed. Plantarum, 1992. 352 p.
- Masaru Wada & Hiroshi Takagi (2006) **Metabolic pathways and biotechnological production of L-cysteine.** *Appl Microbiol Biotechnol.* 73:48–54.
- Mattos C.R.R. (1999) **Meios de cultura com água de coco verde para esporulação de *Microcyclus ulei*.** *Fitopatologia Brasileira*. 24: 470
- Mattos C.R.R., Garcia, D., Pinard, F. Le Guen V. (2003) **Variabilidade de isolados de *Microcyclus ulei* no Sudeste da Bahia.** *Fitopatologia Brasileira*.28 : 502-507.
- MC Donald, B. A., Linde C. (2002) **Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance.** *Annual Review of Phitopathology* 40:349-379.

Medeiros, C. F. L.; Cardoso, M. A.; Ferreira, P. C. G. (2006) **Uso de marcadores microssatélites em estudos de biologia da conservação**. Floresta e Ambiente. V.13, n.2, p. 25-36.

Michael J. Pelczar Jr; E.C.S. Chan; Noel R. Krieg. **Microbiologia: conceitos e Aplicações**. Volume I. 2ª ed. São Paulo: Makron Book, 1996.

Mir, L. **Genômica**. Atheneu, p. 119-137, 2005.

Mitchell, T.K. and Dean, R.A. (1995) **The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea***. *Plant Cell*, **7**,1869–1878.

Miller, J.W. (1966). **Differential clones of *Hevea* for identifying races of *Dothidella ulei***. *Plant Disease Reporter* **50**, 187-190.

Nakyanzi, M. **Molecular and pathogenic diversity of isolates of *Mycosphaerella fijiensis* that cause black Sigatoka disease of bananas in East Africa**. England, University of Greenwich, Natural Resources Institute, 2002. 232 p. (Tese de Doutorado).

Ohlrogge, J.; Benning, C. (2000) **Unraveling plant metabolism by EST analysis**. *Curr. Opin. Plant Biol.* v.3, p.224-228.

Penariol, M. C.; Monteiro, A. C.; Pitelli, R. A. (2008) **Crescimento e esporulação de *Bipolaris euphorbiae* cultivado sob diferentes condições nutricionais**. *Ciência Rural*. **38**(7) 1907-1913.

Pereira, A. V. **Cultura da seringueira em Goiás**. Embrapa Cerrados. 2002. Disponível em: <http://bbeletronica.cpac.embrapa.br/2002/posteres/p2002_79.pdf>. Acesso em: 20 de Janeiro 2010.

Powella, W.; Machray, G. C.; Provan, J. (2006) **Polymorphismo revealed by simple sequence repeats**. *Trends in Plant Science*, Oxford, n. v. 1, p. 215-222.

Prosdocimi, F., Peixoto, F.C.; Ortega, J.M. **Bioinformática: Manual do Usuário**. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília, v. 29, p. 18-31. 2003.

Richards E.; Reichardt M.; Rogers S. (1994) **Preparation of genomic DNA from plant tissue**. Em: *Current Protocols in Molecular Biology* (ed. Benson Chanda V), Vol. 1. John Wiley, Harvard.

Rivano, F. (1997). **South American leaf blight of *Hevea*: variability of *Microcyclus ulei* pathogenicity**. *Plantation Recherche, Devel.* **4**: 104-114.

Romero, I. A.G.; Aristizábal, F. A.; Castanõ, D. M. (2006) **A review of the *Microcyclus ulei* fungus, causative agent of South American rubber-leaf blight**. Rev. Colombia Biotecnologia. Vol. VIII N° 2 p. 50-59.

Santos, R. C. et al. **Assesment of genetic diversity on a sample of cocoa accesions resistant to witches broom disease based on RAPD and pedigree data**. *Bragantia*, v. **64**, p. 361-368, 2005.

Sevier, Carolyn S.; Kaiser, Chris A. (2002) **Formation and transfer of disulphide bonds in living cells.** *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 836–47.

Silva-Pinhati Ana C.O.; Jr Bacci, M. Ciqueira, C. G.; Silva, A. *et al.*(2005) **Isolation and Maintenance of Symbiotic Fungi of Ants in the Tribe Attini (Hymenoptera: Formicidae).** *Neotropical Entomology* 34:001-005.

Sheehan, D.; Meade, G.; Foley, V. M. e Dowd, C. A. (2001) **Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily.** *Biochemical Society* 360, 1-16.

Soanes, D. M. e Talbot, N. J. (2006) **Comparative genomic analysis of phytopathogenic fungi using expressed sequence tag (EST) collections.** *Molecular Plant Pathology.* 7(1), 61-70.

Sousa L.A., Andrade S.J., Gesteira A.da S., Pujade Renaud V., Júlio César de Matos Cascardo J.C.de M., Garcia D. (2006) **Prováveis genes de resistência envolvidos na interação *Hevea* – *Microcyclus ulei*.** XII Seminário de Iniciação científica da Universidade Estadual de Santa Cruz. p168-169.

Temnykh, S.; Lukashova, A.; Cartinhour, S.; DeClerck, G.; Lipovich, L.; Mc Couch, S. (2001) **Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon association and genetic marker potencial.** *Genome research.* 11: 1441-1452.

Van den Ackerveken GFJM, Van Kan JAL, Joosten MHAJ, Muisers JM, Verbakel HM, DeWit PJGM. (1993) **Characterization of two putative pathogenicity genes of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*.** *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:210-15.

Van Zijll de Jong E., Guthridge K.M., Spangenberg G.C. and Forster J.W. (2003) **Development and characterization of EST-derived simple sequence repeat (SSR) markers for pasture grass endophytes.** *Genome.* 46:277-290.

Vettore, A.L. Silva, F.R. Kemper, E.L. E Arruda, P.(2001) **The libraries that made SUCEST** *Genetics and Molecular Biology*, 24 (1-4), 1-7.

Viaud, Muriel; Legeai, F. ; Pradier, J. ; Brygoo. Y. *et al.* (2005). **Expressed sequence tags from the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*.** *European Journal of Plant Pathology* 111: 139–146.

Xu, J.R. (2000) **Map kinases in fungal pathogens.** *Fungal Genet. Biol.* 31, 137–152

Zhong, S., Leng, Y., Friesen, T. L., Faris, J. D., and Szabo, L. J. (2009). **Development and characterization of expressed sequence tag-derived microsatellite markers for the wheat stem rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*.** *Phytopathology* 99:282-289.

Zhu Zhendong; Huo Yunlong; Wang Xiaoming; Huang Junbin & Wu Xiaofei (2004). **Analysis of simple sequence repeats markers derived from *Phytophthora sojae* expressed sequence tags.** *Chinese Science Bulletin* Vol. 49 No. 19 2041—2046.

Anexo A: Tamanho dos produtos de amplificação (pb) para os iniciadores EST-SSRs identificados na biblioteca de cDNA de micélio de *M. ulei*.

Nº Cepas	Locus EST-SSR											
	Mu-SSR 1.4	Mu-SSR 2.3	Mu-SSR 4.2	Mu-SSR 5.5	Mu-SSR 6.3	Mu-SSR 7.0	Mu-SSR 8.0	Mu-SSR 9.0	Mu-SSR 10	Mu-SSR 11	Mu-SSR 12	Mu-SSR 13
PMB 04 <i>M2</i>						70	86	70				
PMB 06 <i>M3</i>						70	86	70				
FTP 07						70	n.d.	70				
PMB 12 <i>M2</i>						70	n.d.	70				
FTP 20 <i>M1</i>						70	n.d.	n.d.				
PMB 24 <i>M2</i>						70	86	n.d.				
PMB 25 <i>M1</i>						70	86	70				
PMB 26 <i>M1</i>						70	n.d.	70				
PMB 28 <i>M3</i>						70	n.d.	n.d.				
FTP 35 <i>M1</i>						70	86	70				
PMB 67 <i>M1</i>						70	n.d.	70				
PMB 92 <i>M2</i>						76	n.d.	70				
PMB 94 <i>M1</i>						76	n.d.	n.d.				
Mu 110 BA <i>M1</i>						n.d.	n.d.	70				
Mu 111 BA <i>M1</i>						n.d.	80	70				
Mu 112 BA <i>M1</i>						60	80	70				
Mu 113 BA <i>M1</i>						70	80	70				
Mu 65 BA <i>M1</i>						60	80	70				
Mu 69 BA <i>M1</i>						n.d.	n.d.	70				
Mu 70 BA <i>M1</i>						n.d.	80	70				
Mu 76 BA <i>M1</i>						60	80	70				
Mu 01 ES						n.d.	n.d.	70				
Mu 02 ES						n.d.	n.d.	70				
Mu 03 ES						60	80	70				
Mu 04 ES						60	80	70				
Mu 15 MT						60	80	70				
Mu 27 MT						60	80	70				

Mu 29 MT						60	80	70				
Mu 38 MT						n.d.	n.d.	70				
Mu 06 AM						60	80	70				
Mu 08 AM						60	80	70				
Mu 09 AM						60	80	70				

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)