

RESSALVA

Alertamos para ausência dos Anexos,
não incluídos pela autora no
arquivo único original.

Estudo comparativo do genoma e do transcriptoma de *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*) agente da Mancha Preta dos Citros e *Phyllosticta capitalensis*

Inaiara de Souza Pacheco

**Botucatu-SP
2014**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Estudo comparativo do genoma e do transcriptoma de *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*) agente da Mancha Preta dos Citros e *Phyllosticta capitalensis*

Inaiara de Souza Pacheco
Marcos Antônio Machado
Carolina Munari Rodrigues

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Unesp, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas Genética.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Pacheco, Inaiara de Souza.

Estudo comparativo do genoma e do transcriptoma de *Phyllosticta citricarpa* (telomorfo *Guignardia citricarpa*) agente da mancha preta dos citros e *Phyllosticta capitalensis* / Inaiara de Souza Pacheco. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Marcos Antonio Machado

Coorientador: Carolina Munari Rodrigues

Capes: 20202008

1. Expressão gênica. 2. Frutas cítricas - Cultivo. 3. *Guignardia citricarpa* - Patogenicidade. 4. Cítricos. 5. Genomas.

Palavras-chave: Expressão gênica; Genes associados a patogenicidade; RNA-seq.

Inaiara de Souza Pacheco

Estudo comparativo do genoma e do transcriptoma de *Phyllosticta citricarpa*
(telomorfo *Guignardia citricarpa*) agente da Mancha Preta dos Citros e
Phyllosticta capitalensis

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu para a obtenção do título de Mestre no programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Genética.

Orientador: Dr. Marcos Antônio Machado

Comissão examinadora

Marcos Antônio Machado
Centro de Citricultura Sylvio Moreira

Chirlei Glienke
Universidade Federal do Paraná

Paulo Martins Ribolla
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Botucatu, 16 de maio de 2014

*A minha mãe,
Por acreditar incondicionalmente na minha capacidade e cujo amor e
carinho foram indispensáveis para a realização desse trabalho*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao departamento de genética IBB/Unesp - Botucatu e ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira pela oportunidade de realizar esse trabalho;

Ao Dr. Marcos Antônio Machado, pela orientação e por acreditar na minha capacidade para a realização desse trabalho;

A minha co-orientadoda Dra. Carolina Munari Rodrigues, pela paciência, carinho, auxílio e ensinamentos;

Ao Dr. Marco Aurélio Takita pelo auxílio nas análises bioinformáticas;

A Dra. Michele Clàrie Breton pela amizade, paciência e pelos conhecimentos que me ensinou e pela ajuda com as análises bioinformáticas;

Ao Dr. Ronaldo Dálio pelas significativas contribuições para esse trabalho;

Aos funcionários do Centro de citricultura, pesquisadores e Pós- doutorandos pelo companheirismo e conhecimentos compartilhados;

As amigas da pós-graduação: Natália (Xeí), Crisley, Ana Paula e em especial para Alessandra Tenório, que acompanhou o meu desenvolvimento profissional desde o meu primeiro ano de iniciação científica e com quem aprendi muito, os meus sinceros agradecimentos pelo carinho, companheirismo e apoio;

Aos amigos do centro de Citricultura: Carol Sardinha, Gabi Arena, Willian, Diogo Maciel, Guilherme, Leonardo em especial para os membros da SALINHA DO AZAR: Silvia, Luciane (LUCIENE!!), Laura, Emilyn, Paulo, Eduardo e cia limitada, pelas experiências pessoais e profissionais compartilhadas, boas risadas e carinho;

Aos amigos (família) do alojamento: Barbara, Rosinha, Laís, Diogo Manzano, Fausto, Tiago, Cíntia, Danila e Simone, por estarem presentes em todos os momentos, bons e ruins, que passei durante o mestrado me apoiando. Um milhão de dissertações não seriam suficientes expressar minha gratidão e o carinho que tenho por vocês. MUITO OBRIGADA!!!

A minha família, pelo apoio, amor e compreensão em todos os momentos;

Aos membros da banca por aceitarem o convite;

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo a pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela concessão de bolsa de estudos



“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”
(Theodore Roosevelt)

RESUMO

PACHECO, I. S. Estudo comparativo do genoma e do transcriptoma de *Phyllosticta citricarpa* (telomorfo *Guignardia citricarpa*) agente da Mancha Preta dos Citros e *Phyllosticta capitalensis*. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências. Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu. 2014.

A Mancha Preta dos Citros (MPC), causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*, é uma das mais importantes doenças da citricultura brasileira. No entanto, muito pouco se sabe sobre os mecanismos de patogenicidade deste patógeno na interação com seus hospedeiros. Além disso, *P. citricarpa* é morfologicamente muito semelhante a *P. capitalensis*, espécie endofítica também em citros, o que dificulta a diferenciação entre elas, gerando evidentes barreiras fitossanitárias à exportação de frutos *in natura*. Do mesmo modo, pouco ainda é conhecido sobre seus genomas, ainda não completamente sequenciados, assim como seus transcriptomas em diferentes condições. Assim, o objetivo geral desse trabalho foi avaliar e comparar os genomas e transcriptomas de *P. citricarpa* e *P. capitalensis*. O sequenciamento genômico com tecnologia Illumina gerou 179.880.616 *reads* para *P. citricarpa* que foram montados em 19.143 *contigs*, e 148.831.020 *reads* de *P. capitalensis* contidos em 11.080 *contigs*. Foram preditas 16.267 ORFs para a espécie patogênica e 14.813 para a espécie endofítica. Ambos os genomas são similares, com quantidades semelhantes de genes na maioria das categorias analisadas. Os transcriptomas por sua vez geraram em média 74 bilhões de *reads* por repetição biológica para ambas as espécies, com 3.074 transcritos diferencialmente expressos, sendo 2.637 mais expressos em *P. citricarpa* e 1.097 em *P. capitalensis*, com expressiva diferença qualitativa em ambas. *P. citricarpa* apresentou maior quantidade de genes expressos que *P. capitalensis* em quase todas as vias analisadas. A espécie endofítica apresentou maior número de genes expressos nas vias de sinalização e adesão. Além disso, os genes envolvidos na interação planta-patógeno foram também mais expressos na espécie endofítica. Os resultados obtidos dos genomas e transcriptomas de *P. citricarpa* e de *P. capitalensis* contribuem para maior compreensão da biologia dessas espécies.

Palavras-chave: RNA-seq; expressão gênica, genes associados a patogenicidade.

ABSTRACT

PACHECO, I. S. Comparative study of genome and transcriptome of *Phyllosticta citricarpa* (Telomoph *Guignardia citricarpa*) the Citrus Black Spot agent and *Phyllosticta capitalensis*. Thesis (Master). Biosciences institute. São Paulo State University “Julio de Mesquita Filho”. Botucatu. 2014

Citrus black spot (CBP), caused by *Phyllosticta citricarpa*, is one of the most important citrus disease in the Brazilian citrus industry. However, the mechanisms of pathogenicity of this pathogen during the interactions with their hosts are poorly understood. *P. citricarpa* is frequently associated with *P. capitalensis*, which is morphologically similar to the endophytic specie. This feature difficults the differentiation of both species resulting in phytossanitary barriers for *in natura* fruit exportation. Moreover, their genomes were not fully sequenced yet and there is a lack of knowledge of their transcriptomes in different conditions. Thus, the overall objectives of this work were to evaluate and compare the genome and transcriptome of both species. The total genome sequence was 179,880,616 reads for *P. citricarpa* and 148,831,020 reads for *P. capitalensis* assembled in 19,143 and 11,080 contigs, respectively. There were predicted 16,267 ORFs for the pathogenic specie and 14,813 for the endophytic specie. *P. citricarpa* and *P. capitalensis* presented very similar amounts of genes. The transcriptomic sequence generated on average 74 billion of reads *per* biological repeat for each species. There were obtained 3,074 differential expressed transcripts, 2,637 were more expressed in *P. citricarpa* and 1,097 in *P. capitalensis*. Transcriptional differences between these species were observed. *P. citricarpa* showed more expressed genes than *P. capitalensis* in most analyzed categories. The endophytic specie presented more expressed genes on signaling pathway and adhesion than the pathogenic specie. Additionally, plant-pathogen interaction genes were expressed on *P. capitalensis*. Thus, the results of genomic and transcriptomic analyses of the *P. citricarpa* and *P. capitalensis* contribute to the biology comprehension of these species.

Key-words: RNA-seq, gene expression, pathogenic genes.

SUMÁRIO

Resumo	v
Abstract	vi
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	3
2.1 Citricultura e Mancha Preta dos Citros	3
2.2 Gêneros <i>Phyllosticta</i> e <i>Guignardia</i>	7
2.2.1 <i>Phyllosticta citricarpa</i> e <i>Phyllosticta capitalensis</i>	8
2.3 Interação planta-fungo	11
2.3.1 Interação planta-fungo endofítico	11
2.3.2 Interação planta-fungo patogênico	12
2.4 Genes de patogenicidade	15
2.5 Análise da expressão gênica	17
2.5.1 Sequenciamento de nova geração	17
2.5.2 PCR quantitativo em tempo Real- RT-qPCR	20
3. Objetivos	22
3.1 Gerais	22
3.2 Específicos	22
4. Material e Métodos	23
4.1 Material Biológico	23
4.2 Sequenciamento do Genoma	23
4.3 Transcriptoma	24
4.4 Análise da expressão de genes candidatos por RT-qPCR	25
5. Resultados e Discussão	30
5.1 Sequenciamento genômico	30
5.1.1 Dados gerais	30
5.1.2 Enriquecimento de vias pelo KEGG	32
5.1.2.1 <i>Metabolismo geral</i>	32
5.1.2.2 <i>Vias de sinalização</i>	33
5.1.2.3 <i>Genes envolvidos com patogenicidade ou simbiose</i>	34
5.2 Análise transcriptômica	35
5.2.1 Dados Gerais	35
5.2.2 Categorização pelo programa Blast2go	36
5.2.2.1 <i>Genes envolvidos degradação da parede celular</i>	46
5.2.2.2 <i>Fatores de transcrição</i>	49
5.2.2.3 <i>Metabólitos secundários</i>	52
5.2.2.4 <i>Proteases e proteínas secretadas</i>	53
5.2.3 Enriquecimento de vias	55
5.3 Análise da expressão gênica por RT-qPCR	59
5.3.1 Genes endógenos	59
5.3.2 Validação do RNA-seq	60
5.3.2 Genes de patogenicidade de fungos	62
6. Considerações finais	65
7. Referência Bibliográfica	67

8. Anexos (CD)

1. Introdução

O Brasil é o segundo maior produtor de citros do mundo, sendo 85% de toda a produção destinada à produção de suco, majoritariamente para exportação para Europa e Estados Unidos. O Estado de São Paulo é responsável por 80% da produção do país e apresenta uma produção estimada em 268,6 milhões de caixas de 40,8 kg para 2014 (Neves, 2010; Citrus Br 2011; FAO, 2013; CONAB, 2013).

Diversas doenças acometem a cultura dos citros, aumentando os custos e as perdas de produção. Dentre essas doenças destaca-se a Mancha Preta dos Citros (MPC), causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*, considerada quarentenária A1 pelos países da Europa e quarentenária A2 pelo EUA.

A MPC afeta quase todas as variedades de citros, depreciando a aparência dos frutos e, em estágios avançados, levando-os a maturação e queda precoce. Os sintomas são mais frequentes em frutos, no entanto, podem ocorrer em ramos verdes, espinhos e folhas (Aguiar-veloso *et al.*, 2002; Almeida, 2010).

O controle da doença é realizado por meio do manejo dos pomares e por aplicações de fungicidas sistêmicos e protetores. A existência de isolados de *P. citricarpa* resistentes a muitos desses princípios ativos já foram relatadas na literatura (Agostini & Peres, 2006; Hendricks, 2013; Possiede & Gabardo, 2009).

O patógeno é frequentemente encontrado associado a uma espécie próxima e endofítica de diversas plantas lenhosas, *Phyllosticta capitalensis*, que é morfológicamente semelhante a *P. citricarpa* o que dificulta a diferenciação das duas espécies (Baayen *et al.*, 2002; Glienke *et al.*, 2011; Glienke-Blanco, 2002).

Após a descrição da espécie endofítica, diversos isolados denominados *P. citricarpa* foram reclassificados para *P. capitalensis* e muitas pesquisas se desenvolveram com a finalidade de elaborar testes capazes de diferenciar rapidamente as duas espécies, impedindo assim que frutos contaminados com a espécie patogênica fossem introduzidos em outras regiões (Rodrigues, 2010).

Os estudos sobre a genética das duas espécies de *Phyllosticta* são recentes. Sabe-se apenas que *P. capitalensis* possui um genoma de aproximadamente 21,5 MB distribuídos em pelo menos oito cromossomos, enquanto que o tamanho do genoma de *P. citricarpa* ainda é desconhecido (Glienke, 1999; Silva, 2008). Entretanto, o genoma completo de ambas as espécies ainda não foi sequenciado.

Aspectos referentes à maquinaria genética requerida pelo fungo patogênico para identificar, penetrar e colonizar a planta hospedeira ainda não são conhecidos. Estudos comparativos (genômica e transcriptômica) entre as espécies patogênica e endofítica de *Phyllosticta* são fundamentais para o entendimento de mecanismos diferenciais que explicariam a patogenicidade ou não destas duas espécies.

Com base nisso, esse trabalho objetivou ampliar os estudos de genômica e transcriptoma dos fungos *P. citricarpa* e *P. capitalensis*, buscando genes diferencialmente expressos nas duas espécies, ou espécie específicos, que poderiam estar associados à patogenicidade. Esse estudo poderá contribuir para o entendimento do processo da doença e, eventualmente, com o desenvolvimento de estratégias de controle da MPC.

2. Revisão de Literatura

2.1 Citricultura e Mancha Preta dos Citros

A citricultura consiste em uma das mais importantes culturas comerciais brasileiras. O celeiro citrícola conta com 175.228 milhões de árvores produtivas e uma produção de 385 milhões de caixas de laranja, sendo que 85% da produção são destinadas a produção de suco concentrado congelado (FCOJ) e não concentrado (NRC), destinados à exportação (Neves *et al.*, 2010; Citros Br, 2013).

Apesar da grande importância, o setor sofre com vários problemas de ordem fitossanitária. Só na primeira década do século XXI, 40 milhões de árvores de citros foram erradicadas devido a pragas e doenças (Neves *et al.*, 2010). Na última safra (2012/2013) foram erradicadas 13,1 milhões de plantas, o que representa 7,5% do parque citrícola nacional e uma redução de 19% na produção (Citros Br, 2013)

A Mancha Preta dos Citros (MPC) afeta, com exceção da lima ácida “Tahiti” e da laranja Azeda e seus híbridos, todas as variedades de citros. Seis sintomas são atribuídos a doença que afeta principalmente a casca dos frutos comprometendo sua aparência. A doença é classificada como quarentenária A1 (ausente no país) pelos países da Europa e Ásia o que limita a exportação de frutos *in natura* para essas regiões (Silva, 2008; Rappussi *et al.*, 2009). Recentemente a doença foi descoberta nos Estados Unidos sendo considerada doença quarentenária A2 neste país (Hu *et al.*, 2013; Schubert, 2010).

Descrita pela primeira vez em 1895 na Austrália (Almeida, 2009), a MPC encontra-se distribuída nas regiões subtropicais do planeta sujeitas a chuvas de verão (Pazoti *et al.*, 2005). No Brasil, a doença foi observada pela primeira vez em 1940 em frutos em uma feira livre no município de Piracicaba. A doença não foi mais encontrada nos pomares brasileiros até década de 1980 quando causou perdas significativas em mexerica no Estado do Rio de Janeiro e, posteriormente, em diversas variedades de laranja doce. Em 1992 foi relatada a presença do fungo em pomares paulistas localizados na região de Conchal e Moji-Guaçu (Aguiar-veloso *et al.*, 2002; Timossi, 2003).

A radiação solar aliada a altas temperaturas favorecem o aparecimento dos sintomas da doença que são mais frequentes em frutos, no entanto, podem ocorrer em folhas, pecíolos, ramos verdes e espinhos (Schinor, 2002; Caixeta *et al.*, 2008).

P. citricarpa é responsável pelo aparecimento de quatro sintomas distintos em frutos com MPC: a mancha dura ou mancha preta, mancha sardenta, falsa melanose e mancha

virulenta (Feichtenberger, 1996). Em 2005, Goes identificou mais dois sintomas que ocorrem no Brasil: a mancha rendilhada e a mancha trincada.

A mancha dura ou mancha preta é o principal sintoma e aparece no início da maturação dos frutos (Figura 1A). O sintoma é caracterizado pela presença de lesões com bordas salientes com depressão no centro. O interior dessas lesões pode apresentar pontuações pretas que correspondem aos picnídios do fungo (esporos assexuais). Os demais sintomas apresentam as seguintes características:

- A falsa melanose que consiste em pequenas lesões definidas não ásperas semelhantes as que ocorrem na doença melanose dos citros causada pelo fungo *Diaporthe citri* (Figura 1B);
- A mancha rendilhada ocorre em frutos verdes e é caracterizada pela presença de lesões sem borda definida de coloração amarela com centro de cor marrom, em lesões mais velhas pode ocorrer a formação de pequenas trincas (Figura 1C);
- A mancha sardenta, caracterizado por lesões definidas de coloração vermelha ou pardo-avermelhada que ocorrem em frutos maduros (Figura 1D);
- Mancha virulenta que ocorre pela fusão de diferentes tipos de sintomas. São lesões irregulares que podem ou não apresentar o centro deprimido (Figura 1E);
- A mancha trincada é um sintoma que ocorre em frutos verdes. É caracterizada por pequenas lesões de formato arredondado que ao envelhecerem formam um grande número de trincas em sua superfície (Figura 1F).



Figura 1. Sintomas de Mancha Preta dos Citros; Mancha preta (A), Falsa melanose (B), Mancha rendilhada (C), Mancha sardenta (D), Mancha virulenta (E), Mancha Trincada; **Fonte:** Citrus disease, 2013; Fundecitrus, 2013.

O ciclo da doença inicia-se com a queda no solo de folhas infectadas com o patógeno. Quando essas folhas entram em decomposição são formados os esporos sexuais do fungo (ascósporos). Esses esporos são levados por correntes de ar ou gotas de água para diversas regiões da mesma ou para outras plantas infectando ramos, folhas e frutos. Nesses tecidos os esporos germinam e o fungo se desenvolve produzindo esporos assexuais (picnídios ou conídios) que podem ser transportados apenas por gotas de água (Figura 2). Com base no ciclo da doença, pode-se inferir que o incremento da doença na planta é realizado pelos picnídios e os conídios são responsáveis pela transmissão da doença para outras plantas e outras áreas (Wickert *et al.*, 2012). No entanto, quando a doença já está instalada não há consenso entre qual estrutura reprodutiva possui maior importância para sua dispersão (Timossi, 2003; Wickert *et al.*, 2012).

Uma característica importante da doença é o seu longo período de incubação. Se o fruto for infectado nos estágios iniciais de desenvolvimento, os sintomas aparecerão apenas no período de transição da cor verde para a amarela, durante a colheita ou ainda no período de transporte (Caixeta *et al.*, 2008).

O controle da doença é realizado através do trato cultural por meio do manejo do mato nas entrelinhas, remoção de folhas caídas, poda de limpeza dos ramos, emprego de irrigação,

antecipação da colheita, utilização de quebra ventos e por uso de controle químico aplicado a partir da queda das pétalas (Fundecitrus, 2013).

Os principais fungicidas utilizados para o controle da doença são os sistêmicos e protetores combinados ou não com óleo mineral ou vegetal. Os fungicidas sistêmicos consistem basicamente em benzimidazóis; e translaminares. A maioria dos fungicidas protetores é a base de cobre ou ditiocarbamatos. No entanto, *P. citricarpa* tem apresentado resistência a muitas dessas substâncias (Schutte & Mansfield, 2003; Agostini & Peres, 2006; Rodrigues *et al.*, 2007; Possiede & Gabardo, 2009; Hendricks, 2013).



Figura 2. Ciclo da MPC: OS conídios formados nas folhas em decomposição são levados por correntes de ar ou gotas de água para diferentes partes da planta ou para outras plantas. Na superfície dos órgãos da planta o fungo se desenvolve manifestando os sintomas e desenvolvendo estruturas de reprodução assexuada (picnídios) que podem ser transportados por gotas de água para outras partes da planta. **Fonte:** Fundecitrus, 2013.

Com a finalidade de obter novos mecanismos de controle da MPC, vários estudos foram desenvolvidos utilizando diversos compostos antimicrobianos e microrganismos antagonistas. Quitosana, ácido salicílico, extrato de albedo de citros e de compostos produzidos por *Letimula edodes* e *Agaricus blazei*, apresentaram ação antifúngica inibindo o crescimento de *P. citricarpa in vitro* e reduzindo a progressão ou o surgimento de novos sintomas em fruto (Rappussi & Benato, 2011; Rappussi & Pascholati, 2009; Cardoso Filho,

2003; Toffano, 2010). A utilização de radiação UV e de microrganismos antagonistas como *Bacillus subtilis*, *Trichoderma spp* e *Saccharomyces cerevisiae* também apresentaram bom resultados contra o patógeno da MPC (Canale *et al.*, 2011).

2.2 Gêneros *Phyllosticta* e *Guignardia*

O gênero *Phyllosticta* foi descrito pela primeira vez em 1818 por Persoon quando ele apresentou esse termo genérico para *Sphaeria lichenoides* DC. Inicialmente, fungos com conídios unicelulares semelhantes aos do gênero *Phoma* que desenvolviam essas estruturas em folhas eram descritos como pertencentes ao gênero *Phyllosticta* (Wikee *et al.*, 2011).

O gênero é relatado como endofítico, patógeno ou saprófito de várias espécies vegetais. Podendo causar manchas ou queima foliar e mancha preta em frutos de espécies comercialmente importantes como banana, uva, citros, orquídeas e amora (Wulandari *et al.*, 2009; Glienke *et al.*, 2011; Wikee *et al.*, 2011).

Phyllosticta apresenta também grande importância agrônômica e farmacêutica por produzir metabólitos secundários de atividade antimicrobiana, herbicida e anticancerígena. (Everett & Rees-George, 2006; Stergiopoulos *et al.*, 2013; Vidente *et al.*, 2008; Wikee *et al.*, 2011).

O termo genérico *Guignardia* é designado para a fase telomórfica (sexual) de *Phyllosticta*, no entanto, devido a utilização do sistema de classificação binomial por micologistas a várias décadas, as duas denominações, têm sido utilizadas separadamente e apenas uma pequena parte de fases telomórficas de *Phyllosticta* foram descritas como *Guignardia*. Devido essas denominações aleatórias os conceitos de espécie dentro desses gêneros são confusos (Wikee *et al.*, 2011).

Poucos são os estudos que decifram as relações filogenéticas entre *Phyllosticta* e *Guignardia*. Motohashi *et al.* (2009) utilizando sequências *Internal transcribed spacer* (ITS) e 18S rRNA relacionou filogeneticamente espécies japonesas de *Phyllosticta* e *Guignardia*, demonstrando que *Phyllosticta* é um clado monofilético. Utilizando uma análise combinada de sequências ITS, TEF1 (*Translation elongation factor*), actina e GPDH (gliceraldehide-3-phosphate dehidrogenase), Glienke *et al.* (2011) analisou diversos isolados de *Phyllosticta* e *Guignardia* que ocorrem em citros. Três novas espécies foram descritas nesse trabalho, além de desvendar as relações filogenéticas entre *P. citricarpa*, *P. capitalensis*, *G. mangiferae* e *P. citriasiatica*.

Estudos sobre populações de *Phyllosticta* que ocorre em citros também foram efetuados na Austrália (Miles *et al.*, 2013) e na China, com a identificação de mais uma espécie de *Phyllosticta* patogênica de citros: a *P. citrichinaensis* (Wang *et al.*, 2011).

Em 2011, o Código Internacional de Nomenclatura de algas, fungos e plantas (antigo Código Internacional de Nomenclatura Botânica) determinou que os nomes de fungos anamorfos e telomorfos apresentem o mesmo status priorizando o termo genérico mais antigo ou mais importante e amplamente utilizado (Hawksworth *et al.*, 2011). A nova redação entrou em vigor em primeiro de Janeiro de 2013. Assim, o nome *Phyllosticta* prevaleceu sobre *Guignardia* por ser o primeiro descrito, apresentar um número maior de espécies descritas e por ser conhecido como causador de doenças importantes (Glienke *et al.*, 2011; Wikee *et al.*, 2011; 2013a).

Schoch e colaboradores (2006) propuseram que o gênero *Guignardia*, até então classificado como pertencente a ordem Dothideales, fosse considerado membro da ordem Botryosphaerales, família Botryosphaeriaceae. No entanto, estudos subsequentes demonstraram que o gênero apresentava características distintas dos demais membros da família Botryosphaeriaceae, sugerindo uma reclassificação (Wikee *et al.*, 2013b). Nesse sentido, Wikee e colaboradores (2013) sugeriram que o gênero fosse classificado como membro da família Phyllostictaceae, um grupo irmão de Botryosphaeriaceae.

2.2.1 *Phyllosticta citricarpa* e *Phyllosticta capitalensis*

Phyllosticta citricarpa é um ascomiceto pertencente à ordem Botryosphaerales e família Phyllostictaceae. Foi descrita pela primeira vez em 1889 por McApline recebendo a denominação de *Phoma citricarpa* McApline. A fase telomórfica ou sexuada (*G. citricarpa*) foi descrita em 1948 por Kiely, e em 1973 Van der Aa reclassificou a fase anamórfica para *P. citricarpa* (Baayen *et al.*, 2002; Wikee *et al.*, 2011). As fases sexual e assexual são frequentemente encontradas associadas no campo, no entanto em condições de laboratório a fase sexuada é dificilmente encontrada (Timossi, 2003).

A fase sexual produz pseudotécios e ascósporos apenas em folhas caídas ou em decomposição. Os ascos apresentam forma clava, são bitunicados e arredondados na extremidade superior. No interior deles encontram-se oito ascósporos unicelulares, hialinos, levemente acinzentados, cobertos com um quepe gelatinoso nas extremidades (Baayen *et al.*, 2002; Glienke *et al.*, 2011). Os ascósporos são resistentes ao ressecamento favorecendo a disseminação a curtas distâncias por meio de respingos de gotas d'água das folhas caídas até a

superfície de órgãos das partes baixas das plantas e a longas distâncias por correntes de ar (Robbs & Bittencourt, 1995; Feichtenberger *et al.*, 1996; Wickert *et al.*, 2012).

A fase assexual produz picnídios em lesões de frutos e pedúnculos, folhas caídas ou aderidas e em ramos mortos. Estes são pequenos, globosos, pretos e semi-eruptivos. No interior dos picnídios encontram-se os conídios (picnidiósporos) que são unicelulares, ovoides, elípticos ou subglobosos, cobertos por uma membrana gelatinosa. Possuem baixa resistência ao ressecamento, sendo a água o principal veículo de dispersão e o fator limitante para a germinação dos mesmos (Robbs & Bittencourt, 1995; Feichtenberger *et al.*, 1996; Baayen *et al.*, 2002; Schinor, 2002; Reis *et al.*, 2006; Glienke *et al.*, 2011).

Após a germinação dos esporos na superfície dos órgãos susceptíveis, forma-se o apressório através do tubo germinativo que penetra através da cutícula e forma uma massa de hifas entre a cutícula e a epiderme. Esse micélio pode permanecer quiescente por meses ou anos até o surgimento de condições favoráveis. Em folhas e ramos esse período pode ser interrompido quando ocorre a morte desses tecidos. Em frutos a quiescência pode ser interrompida quando os frutos iniciam sua maturação ou quando são expostos à intensa radiação (Schinor, 2002; Aguiar-veloso *et al.*, 2002; Almeida, 2010).

P. citricarpa cresce de forma lenta atingindo 7 cm de diâmetro em 20 dias a 28°C em diferentes meios de cultura. A colônia apresenta coloração negra de aspecto granuloso com margens lobosas e micélio submerso. Em meio aveia-ágar ocorre a formação de um halo amarelo ao redor da colônia, característico da espécie (Baayen *et al.*, 2002; Baldassari *et al.*, 2007).

Em 1964 McOnie isolou duas cepas de *P. citricarpa*. Ele denominou de saprotrófica a cepa que quando inoculadas em frutos de laranja não desenvolviam sintomas e patogênica a cepa que quando inoculada produzia sintomas. As duas cepas apresentavam características morfológicas muito semelhantes, sendo este critério não muito confiável para distingui-las (Baayen *et al.*, 2002; Bonants & Carroll, 2003; Everett & Rees-George, 2006; Glienke-Blanco, 2002). Baayen e colaboradores demonstraram por meio de estudos moleculares e cultivo *in vitro* que a cepa saprotrófica é na verdade outra espécie conhecida como *Guignardia mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*) geralmente endofítica de plantas lenhosas (Baayen *et al.*, 2002; Bonants & Carroll, 2003).

Após a descrição da espécie endofítica, diversos isolados denominados *G. citricarpa* foram reclassificados para *G. mangiferae* e diversas pesquisas foram desenvolvidas com a finalidade de elaborar testes capazes de diferenciar rapidamente as duas espécies impedindo assim que frutos contaminados com a espécie patogênica sejam introduzidos em regiões que

não possuem a doença (Bonants & Carroll, 2003; Everett & Rees-George, 2006; Meyer *et al.*, 2006; Peres & Harakava, 2007; Van Gent-Pelzer *et al.*, 2007; Rodrigues, 2010).

P. capitalensis é um ascomiceto, pertencente à ordem Botryosphaerales e família Phyllostictaceae. Endofítica em diversas espécies vegetais, foi descrita pela primeira vez em 1908 por Hennings ocorrendo em *Stanhopea sp.* (Orquidaceae) no Brasil (Wikee *et al.*, 2013a). Em 2001, Okane e colaboradores descreveram *P. capitalensis* como endofítica em ericáceas sendo sua fase telomórfica *Guignardia endophyllicola*. No ano seguinte, Bayeen (2002) caracterizou por meio de técnicas moleculares *P. capitalensis* como endofítica de citros, considerando *G. edophyllicola* e *G. mangiferae* como sendo a mesma espécie. *G. mangiferae* foi descrita em 1968 por Roy causando manchas foliares em *Mangifera indica* (Anacardiaceae).

A incerteza sobre qual o nome correto para utilizar na espécie endofítica de citros permaneceu até 2011, quando Glienke demonstrou que *P. capitalensis* e *G. mangiferae* são duas espécies distintas, sendo a primeira a endofítica de citros e a última a causadora de mancha foliar em manga (Glienke *et al.*, 2011).

Em meio de cultura a morfologia de *P. capitalensis* assemelha-se às de *P. citricarpa*. No entanto, a espécie endofítica apresenta um crescimento mais rápido e não forma halo amarelo ao redor da colônia quando cultivada em meio aveia-àgar (Baayen *et al.*, 2002; Baldassari *et al.*, 2007).

O conhecimento sobre a genética dessas espécies e suas interações com o hospedeiro são escassos e recentes. Glienke (1999) empregou a técnica de eletroforese de campo pulsado para determinar o tamanho e o número de cromossomos de isolados patogênicos e não patogênicos de *P. citricarpa*. O resultado obtido foi um genoma de 21,5 MB distribuídos em oito cromossomos.

Empregando a mesma técnica de Glienke, Silva (2008) conseguiu observar a presença de oito cromossomos em *P. capitalensis* e sete cromossomos em *P. citricarpa*, no entanto, o tamanho dos genomas das espécies não foi estipulado por esse estudo.

Estudos pioneiros com transformação genética de *P. citricarpa* foram realizados utilizando o gene repórter GFP e mediadas pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (Figueiredo *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2013). Nas análises de microscopia eletrônica, observaram-se os estágios de colonização dos transformantes em frutos de laranja doce, onde após a penetração do fungo formou-se uma massa micelial ao redor das células epidérmicas seguida de uma colonização dos espaços intercelulares (Rodrigues *et al.*, 2013).

Diferença na produção de enzimas hidrolíticas é um fator capaz de diferenciar as espécies endofítica e patogênica de *Phyllosticta* de citros. Tais enzimas são importantes nos estágios iniciais de infecção por promover a degradação da parede celular das células vegetais facilitando a colonização da planta hospedeira. Análises enzimáticas apontaram significativas diferenças na produção de amilases, pectinases, endoglucanase, esterase, xilanase e endopoligalacturonase entre as duas espécies, sendo a espécie patogênica a maior produtora dessas substâncias (Romão, *et al.*, 2011; Rodrigues, 2010). A produção de pectinases por *P. citricarpa* sugere que tais substâncias são importantes para a sintomatologia da doença uma vez que as lesões são induzidas principalmente em regiões ricas em pectina. Em *P. capitalensis* essa substância provavelmente está envolvida na colonização endofítica ou de regiões senescentes do hospedeiro (Romão *et al.*, 2011). Apesar de demonstrar a importância dessas enzimas, os trabalhos não demonstraram se a expressão desses genes possui efeito significativo na patogenicidade.

2.3 Interação planta-fungo

Uma grande parte das espécies de fungos vive associada às plantas. A maioria dessas interações não resulta em sintomas de doenças na planta hospedeira. Isso ocorre devido à maioria das espécies de fungos interagir de forma mutualística com a planta hospedeira. Acredita-se que apenas 10% de todas as espécies conhecidas de fungos sejam capazes de causar doenças em plantas (Kahman & Basse, 2001). Outro fator importante é que contra os organismos causadores de doenças, as plantas contam com um sistema de defesa, muitas vezes eficiente (Jones & Dangl, 2006).

2.3.1 Interação planta-fungo endofítico

São considerados fungos endofíticos aqueles que colonizam os tecidos internos da planta durante uma parte ou em todo o seu ciclo de vida sem causar dano aparente ao hospedeiro (Hyde & Soyong, 2008; Toffano, 2010; Aly *et al.*, 2011). Muitos fungos endofíticos podem se tornar patogênicos durante a senescência da planta. Acredita-se que todas as plantas são hospedeiras de pelo menos um fungo endofítico (Aly *et al.*, 2011).

Algumas espécies de fungos endofíticos são transmitidas verticalmente por meio das sementes dos seus hospedeiros. Porém, a maioria desses microrganismos é transmitida

horizontalmente por esporos que são levados pelo vento e infectam a planta através de aberturas naturais, como estômatos, hidatódios e raízes, por ferimentos ou de forma ativa por meio da formação de estruturas de infecção e pela produção de enzimas degradadoras de parede celular como os fungos fitopatogênicos (Saikkonen *et al.*, 1998).

A maioria das comunidades endofíticas aparenta ser hospedeiro-específica ou são adaptadas a condições de micro-habitat ou microclima específicas. Por outro lado, espécies dos gêneros *Phoma*, *Phomopsis*, *Colletotrichum* e *Phyllosticta* apresentam uma ampla gama de plantas independentes, levando essas espécies a desenvolver mecanismos para superar as defesas de diversos hospedeiros (Suryanarayanan *et al.*, 2009).

Como resultado da condição fisiológica de diferentes partes da planta ou da pressão de seleção formada a partir de diferentes endofíticos que colonizam a mesma planta, os fungos endofíticos podem ser tecido ou órgão específico, colonizando apenas partes específicas da planta (Hyde & Soyong, 2008).

A relação planta-fungo endofítico é mantida por um equilíbrio fisiológico e genético que beneficia ambas as espécies. Os fungos endofíticos promovem nas plantas hospedeiras tolerância a estresse biótico e abiótico, aumentando a resistência à seca, bem como a tolerância à alta temperatura e alta salinidade e, em alguns casos, resistência a patógenos (Dyakov *et al.*, 2007). Em contra partida a planta fornece para o fungo proteção contra dissecação, nutrição, compostos importantes para a conclusão do ciclo de vida, crescimento e defesa, além de disseminar a próxima geração do fungo através de suas sementes (Aly *et al.*, 2011).

2.3.2 Interação planta-fungo patogênico

Os fungos fitopatogênicos podem ser classificados em três grupos de acordo com a interação com o hospedeiro:

- **Fungos biotróficos:** São fungos que parasitam tecidos vivos. Esses organismos ultrapassam as barreiras iniciais da planta (cutícula) por meio da formação de um apressório. No interior da planta, o fungo utiliza enzimas degradadoras de parede celular para penetrar no interior da célula. Essas enzimas degradam apenas regiões pontuais da parede celular vegetal, pois podem ser imobilizadas por interações iônicas e mantidas em pontos restritos. Ao alcançar a membrana plasmática da célula vegetal os fungos biotróficos formam uma hifa de alimentação denominada haustório (Horbach *et al.*, 2011).

- **Fungos necrotróficos:** São fungos que matam a célula hospedeira para se alimentar. Após a formação do apressório, o fungo pode matar as células hospedeiras pela secreção de toxinas peptídicas de baixo peso molecular ou pela da indução da morte celular através de espécies reativas de oxigênio (ROS).
- **Fungos hemi-biotróficos:** Possui um estilo de vida intermediário entre o biotrófico e o necrotrófico. Esses fungos apresentam a capacidade de colonizar tecidos vivos ou mortos.

De um modo geral, as plantas possuem duas linhas de defesa contra patógenos. A primeira é denominada resistência passiva ou constitutiva formada por elementos estruturais como a cutícula, tricomas, parede celular rígida sobre células epidérmicas, e compostos anti-microbianos pré-formados. A segunda linha é denominada resistência ativa ou induzida, que ativam diversos genes dentro da célula, ativando reações de hipersensibilidade, mecanismos de fortalecimento da parede celular, síntese de compostos anti-microbianos adicionais, entre outros (Dikson, 2003).

Nos estágios iniciais da infecção, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs- *pathogen-associated molecular patterns*) são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs- *pattern recognition receptors*) na membrana plasmática da célula hospedeira desencadeando processos de defesa (Bittel & Robatzek, 2007). PAMPs foram inicialmente descritos como moléculas conservadas dos microrganismos que possuem função essencial na aptidão ou sobrevivência do microrganismo, mas não são essenciais para a patogenicidade (Bittel & Robatzek, 2007). Como essas moléculas também podem ser encontradas em microrganismos não patogênicos, a nomenclatura padrões moleculares associados a micróbios também pode ser empregada (MAMPs- *microbial-associated molecular patterns*) (Thomma, Nürnberger, & Joosten, 2011).

Os PRRs desencadeiam uma resposta imune inata, denominada imunidade desencadeada por PAMP (PTI - *PAMP-triggered immunity*), qual ativa mecanismos de defesa contra o patógeno. Essa é uma defesa basal da planta sendo um mecanismo patógeno-não específico que induz a cascata de sinalização MAP quinase, a transcrição de genes de resposta a patógenos, produção de ROS e a deposição de calose para reforçar a parede celular e impedir o desenvolvimento do patógeno (Fu & Dong, 2013; Thomma *et al.*, 2011).

Uma vez reconhecido pelo hospedeiro através dos PRRs, os patógenos desenvolveram outra estratégia capaz de burlar a resposta imune do hospedeiro, facilitando sua entrada e desenvolvimento da doença. Essa estratégia é a secreção de proteínas efetoras que suprimem

PTI promovendo a susceptibilidade desencadeada por efector (ETS- *effector triggered immunity*) (de Jonge, Bolton, & Thomma, 2011).

Efetores são moléculas secretadas por um organismo que modificam a fisiologia de outro organismo. Caracterizados por serem pequenas proteínas ricas em cisteína que não possuem aparente homologia com outras proteínas. Os efetores são classificados em: apoplásticos e citoplasmáticos. Os efetores apoplásticos são secretados no espaço extracelular da planta e interagem diretamente com as defesas do hospedeiro, protegendo o patógeno contra a ação de enzimas hidrolíticas secretadas pela planta (de Jonge *et al.*, 2011; Göhre & Robatzek, 2008; Hogenhout *et al.*, 2009). Os efetores citoplasmáticos são translocados para o interior da célula. Bactérias possuem um sistema de secreção especializado para injetar seus efetores. Fungos e oomicetos secretam os efetores no interior da célula hospedeira através do haustório (Hogenhout *et al.*, 2009).

Por sua vez, as plantas desenvolveram proteínas de resistência (proteínas R) que reconhecem os efetores de forma direta ou indireta por meio de uma proteína acessória. Efetores e proteínas de resistência são mecanismos evolutivamente recentes e patógeno-específico (Thomma *et al.*, 2011). As proteínas R ativam a imunidade ativada por efector (ETI). Esse tipo de imunidade é patógeno-específica e desencadeia reações de hipersensibilidade (HR) e resistência sistêmica adquirida (SAR) (Fu & Dong, 2013).

Após a superação dos efetores pelas proteínas R do hospedeiro, novos efetores são desenvolvidos pelo patógeno a fim de burlar as defesas imunológicas da planta e conseqüentemente, novas proteínas R serão geradas pelas plantas. Esse mecanismo de co-evolução entre plantas e patógenos foi nomeado como modelo de zigue-zague por Jones e Dangl (2006).

2.4 Genes de patogenicidade

São considerados genes de patogenicidade todos aqueles que estão envolvidos no desenvolvimento da doença e que não são essenciais para o desenvolvimento do ciclo de vida do patógeno *in vitro* (Wouw & Howlett, 2011). Didaticamente esses genes podem ser divididos em seis grupos: genes envolvidos no reconhecimento do hospedeiro e na sinalização; genes envolvidos na produção de estruturas de infecção (apressório); na penetração; na supressão da defesa do hospedeiro; na produção de toxinas e na nutrição do patógeno (Idnurm & Howlett, 2001; Tudzynski & Sharon, 2003; Wouw & Howlett, 2011).

As vias de sinalização são importantes em todos os estágios de desenvolvimento do patógeno e também na patogenicidade. O processo de sinalização envolvido na interação planta-patógeno pode ser dividido em três etapas: percepção ou reconhecimento do sinal é realizada por receptores que reconhecem um determinado sinal, como por exemplo, sinais ambientais ou do hospedeiro. Esse sinal é transmitido (transdução do sinal) por vias que ativam respostas celulares (tradução do sinal) como a formação de estruturas de infecção e secreção de enzimas (Campos *et al.*, 2010; Rodrigues, 2010).

O maior grupo de receptores fúngicos são os receptores acoplados a proteínas-G (GPCRs). Estas estão envolvidas no reconhecimento de sinais externos e regulam diversos processos celulares associados às proteínas heteroméricas G (Xu *et al.*, 2006). Em *Magnaporthe oryzae*, o reconhecimento pode ser realizado pelo gene *Cut2*. Este ativa as vias de sinalização dependentes de AMP (adenosina monofosfato), proteína quinase A, proteína quinase C cíclica e diacilglicerol que promovem a formação do apressório (Wouw & Howlett, 2011).

As principais vias de transdução envolvidas com a patogenicidade são as vias de sinalização cAMP (adenosina monofosfato cíclica) e MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos) auxiliadas por proteínas heteroméricas G. Mutações ou deleções dos genes envolvidos nessas vias interferem na germinação dos esporos e na formação de estruturas de infecção (Idnurm & Howlett, 2001; Tudzynski & Sharon, 2003; Wouw & Howlett, 2011).

Os genes envolvidos na formação de apressórios podem ser divididos em três grupos: Genes expressos antes, mas que são necessários para a formação dessa estrutura – como as vias de sinalização descritas anteriormente; genes que controlam e afetam a germinação do apressório e a penetração no hospedeiro; e genes que são expressos exclusivamente no apressório ou contribuem com características específicas dessa estrutura, como a biossíntese de melanina e glicerol (Tudzynski & Sharon, 2003).

A penetração do fungo na célula hospedeira ocorre de forma ativa através da pressão exercida pelo apressório durante a infecção e secreção de enzimas degradadoras de parede celular. Os genes da biossíntese de melanina e glicerol são essenciais para penetração do apressório, pois conferem a essa estrutura a turgescência necessária para romper as barreiras da parede celular (Tudzynski & Sharon, 2003). As principais enzimas utilizadas para a degradação de parede celular vegetal são pectinases, cutinases, xilanases e celulases. A síntese dessas enzimas está frequentemente associada a mais de um gene correlacionado ou a famílias gênicas o que dificulta o conhecimento da ação dessas enzimas na patogenicidade (Idnurm & Howlett, 2001).

A penetração do fungo pode ser percebida pela planta hospedeira que desencadeia uma série de respostas fisiológicas contra a invasão. Oligossacarídeos de quitina (componente da parede celular dos fungos) liberados durante a infecção podem atuar como PAMPs ativando a imunidade inata das plantas que leva a produção de fitoalexinas (metabólitos secundários produzidos pela planta em resposta a um agente patogênico). Além dessas substâncias, metabólitos secundários que estão constitutivamente presentes na planta e apresentam atividade antimicrobiana atuam na defesa contra patógenos (fitoanticipinas). Contra essas substâncias os fungos sintetizam enzimas capazes de degrada-las como, saponinas (Tudzynski & Sharon, 2003).

A produção de substâncias tóxicas que desabilitam funções celulares do hospedeiro ou matam células é um fenômeno muito comum em fungos. Tais substâncias podem ser hospedeiro-específicas, quando seu efeito é restrito a uma única espécie ou não-específicas, afetando uma ampla gama de plantas. Estas últimas foram os primeiros determinantes de patogenicidade confirmados pela genética molecular (Idnurm & Howlett, 2001; Tudzynski & Sharon, 2003).

As toxinas fúngicas são, em sua maioria, metabólitos secundários, cuja síntese envolve enzimas NPRS (*nonribosomal peptide synthetases*) e PKs (*polyketide synthases*). Conseqüentemente, perturbações nesses genes levam a redução da patogenicidade (Xu *et al.*, 2006).

Transportadores também são muito importantes para a patogenicidade, pois deslocam substâncias endógenas ou exógenas, auxiliando a secreção de micotoxinas e a desintoxicação de compostos antimicrobianos produzidos pelo hospedeiro. Os transportadores ABC (*ATP-binding cassette transporter*) e MFS (*major facilitator superfamily transporter*) são os mais bem caracterizados e estão envolvidos na resistência a multidrogas (Horbach *et al.*, 2011; Idnurm & Howlett, 2001; Tudzynski & Sharon, 2003).

Uma das primeiras respostas da planta contra o patógeno é a produção de ROS (Tudzynski & Sharon, 2003). A forma como o patógeno lida com o estresse oxidativo pode interferir no seu potencial patogênico. Fungos biotróficos recorrem a síntese de enzimas desintoxicantes para superar o efeitos do ROS. Em contra partida, ROS favorece a patogenicidade de fungos necrotróficos que produzem e estimulam a produção dessas substâncias pelas plantas levando a morte celular e necrose das regiões do hospedeiro afetadas (Bolwell & Daudi, 2009; Tudzynski & Sharon, 2003).

Mutações em diversos genes envolvidos na nutrição levam a redução da patogenicidade. Estudos demonstraram que perturbações em genes das vias do glioxalato,

oxidação de ácidos graxos, transportadores de sacarose e síntese de sideróforos (peptídeos responsáveis pela aquisição de ferro) levam a redução de patogenicidade em diversos fungos fitopatogênicos (Dunn *et al.*, 2009; Oide *et al.*, 2006; Wahl *et al.*, 2010; Wouw & Howlett, 2011)

2.5 Análise da expressão gênica

2.5.1 Sequenciamento de nova geração

O sequenciamento de nova geração (*Next generation sequence*, NGS) consiste em técnicas de sequenciamento em larga escala e de alto rendimento. Essa metodologia permite o processamento de milhões de sequências em um curto período de tempo de tal forma que projetos de sequenciamento que levariam anos para serem concluídos utilizando os métodos mais antigos, podem ser realizados em semanas.

As bibliotecas de fragmentos de DNA geradas por essas tecnologias não são oriundas de processos de clonagem em vetores tradicionais, o que impede que erros de clonagem interfiram no sequenciamento. A principal característica dessas novas plataformas é a geração de milhões de fragmentos curtos de DNA, com tamanhos que variam de 20 a 400 pb, o que torna essa técnica capaz de gerar informações muitas vezes maior que o sequenciamento Sanger (Ansorge, 2009; Zhang *et al.*, 2011).

As tecnologias NGS podem ser divididas em duas classes: as baseadas em PCR e as de sequenciamento de “molécula única” (*single- molecule sequence*-SMS). O primeiro grupo é constituído pelas plataformas 454 FLX (Roche), Solexa (Illumina), SOLiD System, Ion Torrent (Life technologies) e o segundo pelas plataformas Helicos HeliScope, Pacific Biosciences system (Helicos).

Neste trabalho utilizou-se a plataforma Solexa/Illumina para a realização das análises genômicas e transcriptômicas. Assim como no sequenciamento de Sanger, a plataforma Solexa emprega a marcação dos nucleotídeos terminadores com fluoróforos. Nessa tecnologia o DNA é fragmentado e suas extremidades são ligadas a adaptadores. Em seguida, esses fragmentos são fixados em um suporte sólido (*flow cell*). Esse suporte possui oito linhas que podem ser utilizadas para o sequenciamento de oito ou mais bibliotecas em uma única corrida. A superfície dessas linhas é revestida com adaptadores complementares aos adaptadores ligados às extremidades dos fragmentos de DNA. Durante a fixação, os fragmentos de DNA são imobilizados por sua extremidade 5' sobre a superfície e a extremidade 3'-OH é quimicamente inativada para garantir que apenas um nucleotídeo seja adicionado por vez.

Previamente ao ciclo de PCR, a extremidade livre (3'-OH) forma uma estrutura em “ponte” por hidratação ligando-se ao adaptador complementar da *Flow cell* (Figura 3).

A fase de extensão da PCR ocorre nessa estrutura de ponte. 35 ciclos de PCR são realizados formando cerca de 1000 cópias de cada fragmento de DNA. Esses fragmentos permanecem próximos uns dos outros formando *clusters*. Nos ciclos subsequentes de amplificação são fornecidos os nucleotídeos marcados. A alta densidade dos *clusters* permite que a câmera do aparelho de sequenciamento identifique a fluorescência nucleotídeo que foi incorporado. Ao final de cada ciclo ocorre uma etapa de lavagem para a remoção do excesso de reagentes a ativação da extremidade 3'-OH dos fragmentos (Figura 3). Cinquenta milhões de *clusters* podem ser sequenciados por linha da *flow cell* resultando em um rendimento elevado (Ansorge, 2009; Mardis, 2008; Martinez & Nelson, 2010; Shokralla *et al.*, 2012).

Uma das principais aplicações dessas plataformas é o sequenciamento de transcriptomas a partir de bibliotecas de cDNA, conhecido como RNA *deep sequencing* ou RNA-seq. Durante muito tempo utilizou-se a metodologia de microarranjo de DNA para a determinação dos níveis de transcrição em larga escala. No entanto essa metodologia necessita do conhecimento prévio do genoma (Ansorge, 2009; Martinez & Nelson, 2010).

A vantagem do RNA-seq é a possibilidade de identificar transcritos sem a necessidade do conhecimento prévio do genoma do organismo. Além da descoberta de novos transcritos, essa tecnologia pode ser empregada para medir a abundância de transcritos, identificar regiões não traduzidas, variantes de *splicing*, identificar polimorfismos de base simples (SNPs), RNAs interferentes, entre outros (Nowrousian, 2010; Nowrousian *et al.*, 2010).

As tecnologias NGS constituem uma ferramenta em potencial no estudo de microrganismos. O pequeno tamanho do genoma desses organismos permite uma elevada cobertura de sequenciamento. Com a finalidade de melhorar a anotação e a compreensão acerca da genética dos microrganismos, o RNA-seq foi complementarmente empregado nos projetos de sequenciamento genômico de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Aspergillus oryzae*. E o sequenciamento *de novo* de diversos fungos filamentosos também já foi realizado utilizando essa nova metodologia (Diguistini *et al.*, 2009; Martinez & Nelson, 2010; Nowrousian, 2010; Wang *et al.*, 2010).

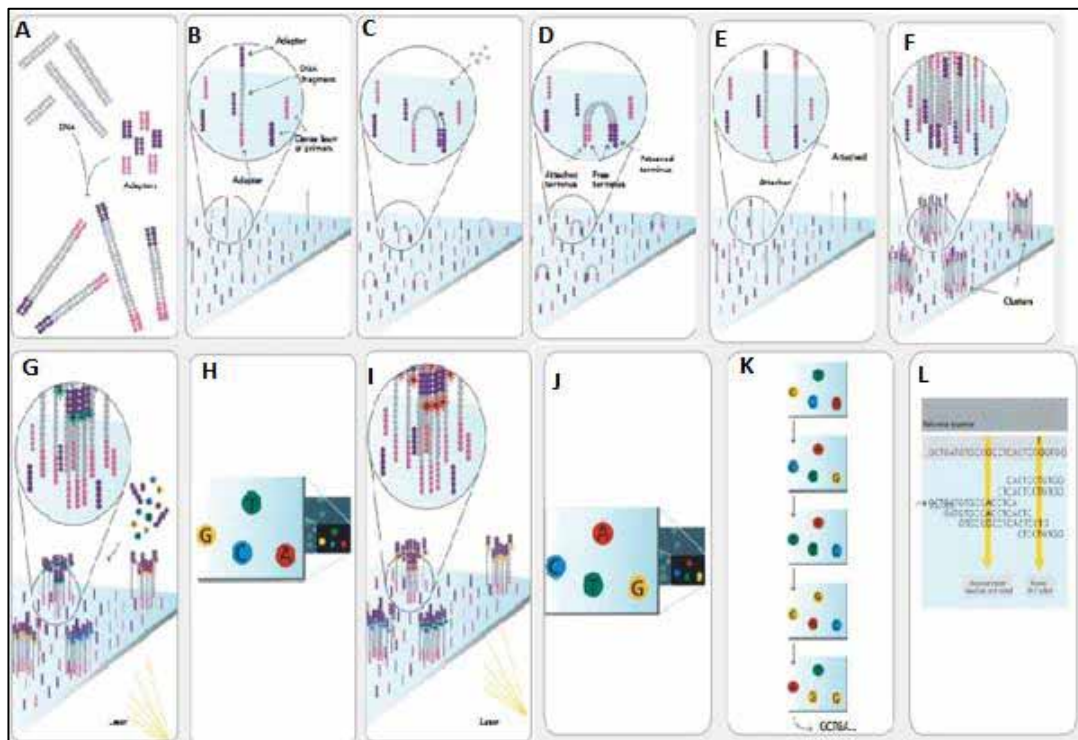


Figura 3: Técnica de sequenciamento plataforma Solexa (Illumina); O DNA é fragmentado e a ele são ligados adaptadores nas extremidades (A). A extremidade 5' é fixada na *flow cell* (B) e a extremidade 3' liga-se ao adaptador complementar no suporte por meio de hibridação formando uma ponte (C) onde ocorre a fase de extensão da PCR formando a fita complementar. O final do ciclo as fitas de DNA são separadas linearizadas (D). O ciclo se repete 35 vezes formando cerca de mil cópias de cada fragmento. Esses fragmentos permanecem próximos uns dos outros formando *clusters* (E). Nas fases subsequentes de amplificação, são fornecidos nucleotídeos marcados (G). A densidade dos *clusters* permite a identificação da fluorescência de cada nucleotídeo quando incorporado (H, I, J). A leitura das bases é feita por análise sequencial das capturas das fluorescências em cada ciclo de sequenciamento (K, L). **Fonte:** Illumina, 2007

Em fungos fitopatogênicos, a tecnologia RNA-seq foi empregado para desvendar as relações desses microrganismos com seus hospedeiros revelando informações importantes sobre os estágios iniciais de infecção, colonização e patogenicidade (Kawahara *et al.*, 2012; O'Connell *et al.*, 2012).

2.5.2 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A técnica de PCR convencional é amplamente utilizada para a quantificação genética através da amplificação das sequências alvo por um número discreto de ciclos. Os produtos da amplificação são geralmente observados por eletroforese em gel de agarose, no entanto, a

técnica apresenta algumas limitações principalmente no que se refere à quantificação da expressão gênica.

Examinando o processo de amplificação, podemos observar que a PCR é limitada pela atividade enzimática e do substrato ao longo das fases. Ao final da reação, quando essas substâncias se desgastam ou vão se tornando escassas, a reação chega a um platô no qual, teoricamente, todas as amostras possuirão a mesma quantidade de DNA total. Isso obscurece qualquer diferença na abundância do cDNA inicial. Outra desvantagem é que a quantificação dos produtos de PCR ao final da reação exalta qualquer pequena diferença entre a eficiência da reação das amostras (VanGuilder & Freeman, 2008).

A PCR em tempo real minimiza esses erros experimentais por meio da quantificação dos produtos da PCR em cada ciclo de amplificação levando a uma medição quantitativa dos produtos acumulados ao longo do processo. A maioria das tecnologias é baseada em fluorescência. As mais empregadas são: fluoróforos intercalantes (*SYBR Green*), sondas que apresentam fluorescência por hidrólise ou hibridização (TaqMan) e *hairpins* fluorescentes (*Molecular beacons*) (Schena, Nigro, Ippolito, & Gallitelli, 2004; VanGuilder *et al.*, 2008).

SYBR Green é um fluoróforo que intercala na dupla fita de DNA. Durante a amplificação, essa molécula se liga ao produto da PCR emitindo fluorescência verde quando excitada pela luz. Apesar da facilidade de uso, o *SYBR Green* liga-se ao DNA de forma indiscriminada, dímeros de *primers* e erros de amplificação podem superestimar a quantificação do gene alvo. A verificação desse tipo de erro ocorre por meio da análise da curva de dissociação. Esta consiste na quantificação da intensidade do *SYBR Green* que é visualizada graficamente em de forma de picos. Como cada *amplicon* possui uma temperatura de *melting* devido a sua composição de nucleotídeos, portanto, a especificidade do produto amplificado se dá através da formação de um único pico.

A análise da expressão de transcritos pode ser realizada em níveis absolutos ou relativos. Na quantificação absoluta o número de cópias de um transcrito é calculado por meio da curva padrão do DNA do gene de interesse. Para isso diluições seriadas com quantidades conhecidas de DNA é realizada e submetida a amplificação. A curva padrão é então utilizada para extrapolar a concentração de partida do sinal de amplificação desconhecido (VanGuilder *et al.*, 2008).

O método $2^{-\Delta\Delta CT}$ de quantificação relativa é o mais utilizado em análises de expressão gênica. Essa metodologia considera que a eficiência de amplificação é 100%, ou seja, a cada ciclo o número de cópias de DNA é duplicado é que existe um gene (ou genes) que é expresso

de forma constante nas amostras (gene endógeno). (Livak & Schmittgen, 2001; VanGuilder *et al.*, 2008).

Para o cálculo da expressão relativa dos genes alvo, o valor de ciclos de quantificação ou *Cycle Threshold* (Ct) de cada amostra precisa ser estimado. O Ct consiste no ponto que detecta o ciclo em que a reação atingiu o limiar da fase exponencial. Para cada amostra é calculada a diferença entre o CT do gene de interesse e do gene endógeno (Δ CT). Em seguida, ocorre a subtração do Δ CT da condição controle (constituída de todos os elementos do grupo submetido ao tratamento, no entanto, sem a variável que pretende avaliar) contra o Δ CT do tratamento ($\Delta\Delta$ CT). Esse valor negativo é utilizado como expoente de 2 na equação que representa a diferença corrigida do Ct (Livak & Schmittgen, 2001).

$$2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-(Ct,tc - Ct,cg)Tratamento - (Ct,tc - Ct,cg) controle}$$

Os genes endógenos devem ser cautelosamente escolhidos para a realização da RT-qPCR, pois eles irão normalizar diferenças entre a quantidade do produto inicial, bem como a eficiência da reação. Para isso esses genes necessitam apresentar algumas características como: apresentar expressão similar em todas as amostras de estudo, apresentar expressão resistente às condições experimentais, e passar pelas fases da reação com a mesma cinética dos genes alvo. (VanGuilder *et al.*, 2008).

A eficiência de genes endógenos candidatos podem ser empiricamente determinadas por meio de algoritmos matemáticos que utilizam os dados obtidos do RT-qPCR desses genes para a realização dos cálculos. Os programas amplamente utilizados para esse fim são o geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004) e Normfinder (Andersen *et al.*, 2004).

3. Objetivos

3.1 Gerais

- Avaliar e comparar o genoma e o transcriptoma de *Phyllosticta citricarpa* e *P. capitalensis*.

3.2 Específicos

- Identificar genes diferencialmente expressos em *P. citricarpa* e *P. capitalensis*.
- Anotar e caracterizar ORFs de *P. citricarpa* envolvidas na patogenicidade em citros.
- Validar a expressão de genes associados à patogenicidade.

4. Material e Métodos

4.1 Material Biológico

Para o desenvolvimento desse estudo foram utilizados os isolados LGMF06 de *P. citricarpa* e LGMF01 de *P. capitalensis*, cedidas pelo Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). LGMF06 foi isolado de lesões de MPC de frutos de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb), enquanto que LGMF01 foi isolado de frutos assintomáticos de lima ácida “Tahiti”. A confirmação das espécies desses isolados foi realizada por análises moleculares e testes de patogenicidade (Glienke *et al.*, 2011; Stringari, 2009).

Os fungos foram cultivados em placas contendo meio de cultura Citros Fabris-Nishimura (CFN) (Figueiredo *et al.*, 2010) e mantidos em BOD a uma temperatura de 25 +/- 3° C. A cada trinta dias foi realizada a repicagem dos fungos por meio da retirada de um fragmento de micélio de uma placa e a transferência deste para outra placa contendo o mesmo meio de cultura.

Com o objetivo de obter DNA e RNA sem contaminantes provenientes do meio de cultura, os isolados de ambos os fungos também foram crescidos em meio CFN líquido e mantidos sob agitação (65 rpm) por sete dias a 25 +/- 3° C no escuro. Após esse período o micélio foi removido do meio, lavado com água destilada, macerado com nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para posterior utilização nos processos de extração de DNA e RNA.

4.2 Sequenciamento do Genoma

O DNA total de *P. citricarpa* e *P. capitalensis* foi extraído de acordo com o protocolo de CTAB cedido pela professora Magnólia de Araújo Campos, da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). A qualidade do DNA foi verificada por meio de gel de agarose 0,8% corado com brometo etídio (0,5 ng/ml) sob luz ultravioleta. A concentração desses DNAs foi determinada no espectrofotômetro Nanodrop 8000 (Uniscience).

Dez microgramas de DNA de cada espécie foram enviados à empresa MacroGen (Coréia do Sul) para a realização do sequenciamento utilizando a plataforma *Genome AnalyzerIIx*[®] (Illumina). Todos os procedimentos de sequenciamento foram realizados de acordo com os protocolos da Illumina. Foram gerados fragmentos *paired-end* com tamanho aproximado de 101 pares de base (pb).

Os resultados foram enviados em formato FASTA com qualidade $Phred \geq 20$ (Ewing *et al.*, 1998). A montagem *de novo* do genoma foi realizada utilizando o *software* CLC Genomics Workbench (<http://www.clcbio.com>). Para a predição das ORFs (*Open read frames*) foi utilizado o programa Augustus (Stanke *et al.*, 2004). A anotação e categorização das ORFs foram realizadas automaticamente no programa Blast2GO e pela ferramenta KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Conesa *et al.*, 2005; Kanehisa & Goto, 2008; Kanehisa *et al.*, 2011).

Para a estimativa da cobertura do sequenciamento foi realizado o seguinte cálculo:

$$\frac{N_{reads} \cdot X \cdot T_{reads}}{T_{genoma}}$$

Sendo:

N_{reads} = número de leituras disponíveis;

t_{reads} = tamanho médio, em pares de bases, das leituras, nesse caso foi usado 96 pb;

T_{genoma} = tamanho, em pares de bases, do genoma referencia.

Adotou-se como tamanho do genoma 21,5 Mb para as duas espécies estudadas. Esse valor foi determinado por Glienke (1999) para isolados de *P. citricarpa* por meio de eletroforese de campo pulsado.

4.3 Transcriptoma

Para as análises de transcriptomas foram utilizadas três repetições biológicas de cada espécie dos fungos *P. citricarpa* e *P. capitalensis*. A extração do RNA total foi conduzida de acordo com as instruções do fabricante do kit de extração RNeasy® (Quiagen) e tratado com DNaseRNase Set-Free® (Quiagen).

A qualidade e integridade dos RNAs foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, e pelo aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). A quantificação desses RNAs foi realizada no espectrofotômetro Nanodrop 8000 (Uniscience).

Dez microgramas de RNA total foram enviadas para a empresa MacroGen para a realização do RNA-seq pela mesma plataforma utilizada no sequenciamento genômico. Os resultados também foram enviados em arquivos FASTA com valores de $Phred \geq 20$ como descrito no sequenciamento genômico (Ewing *et al.*, 1998).

A montagem dos transcritos foi realizada através da ferramenta TopHat utilizando como referência as ORFs de *P. citricarpa* (Trapnell *et al.*, 2009). A estimativa da abundância relativa dos transcritos foi feita utilizando a ferramenta Cufflinks, que mede a abundância da

transcrição em fragmentos por kilobase de exon por milhão de fragmentos mapeados (FPKM), e a expressão diferencial foi verificada através do software Cuffdiff (Trapnell *et al.*, 2010).

A anotação e categorização dos transcritos foram realizadas automaticamente pelo programa Blas2GO e pela ferramenta KEGG (Conesa *et al.*, 2005, Kanehisa & Goto, 2008; Kanehisa *et al.*, 2011). Para a identificação de transcritos que codificam possíveis proteínas secretoras (efetores), os peptídios sinal foram preditos utilizando a ferramenta SignalP 3.0 (Bendtsen, *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 2011).

Complementarmente a essas análises foi realizada busca por genes envolvidos com patogenicidade em *P. citricarpa* e *P. capitalensis* através do alinhamento local dos transcritos expressos nessas espécies contra as sequências do banco de dados de interação patógeno-hospedeiro (Winnenburg *et al.*, 2008).

4.4 Análise de expressão gênica por RT-qPCR

Dois genes superexpressos em cada espécie (*P. citricarpa* e *P. capitalensis*) foram selecionados para validação do sequenciamento transcriptômico através de RT-qPCR.

As sequências desses genes foram alinhadas entre as duas espécies por meio de blastN (Johnson *et al.*, 2008). Os *primers* foram desenhados nas regiões conservadas compartilhadas entre as espécies estudadas utilizando a ferramenta Primer blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). As penalidades dos *primers* foram verificadas utilizando a ferramenta Primer 3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>).

A especificidade dos *primers* foi confirmada por sequenciamento no equipamento ABI 3730 – Applied Biosystems de acordo com as instruções do fabricante (Life Technologies) utilizando como molde produto de PCR. As sequências obtidas foram alinhadas contra banco de dados de sequências do NCBI (*National Center for biotechnology information*) utilizando a ferramenta BlastX (Johnson *et al.*, 2008). Além do sequenciamento, a especificidade também foi verificada através da curva de dissociação obtida após o RT-qPCR. Esse procedimento é realizado para a verificação de ampliações inespecíficas decorrentes de possíveis contaminações.

Para as avaliações por RT-qPCR, foram usadas as mesmas amostras de *P. citricarpa* e *P. capitalensis* utilizadas para o sequenciamento dos transcriptomas. Para a síntese do cDNA (DNA complementar) foi utilizado 500 ng/μl do RNA total das amostras. A síntese foi

conduzida utilizando o Kit RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis® (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Ao final da reação, todos os cDNA foram diluídos 1:25 para posterior uso nas análises de expressão gênica.

Para a realização do RT-qPCR foram utilizadas três repetições biológicas de cada condição, e três repetições técnicas. As reações foram realizadas usando 2 µl dos cDNAs diluídos e o kit FAST SYBR Green Master Mix® conforme instruções do fabricante (Life technologies).

Os dados de fluorescências gerados na RT-qPCR foram exportados para o software Miner para a determinação da eficiência dos *primers* e o cálculo do Cq. O valor de Cq é obtido através de um algoritmo de regressão linear que se baseia na cinética das reações individuais sem a necessidade de curva padrão (<http://www.miner.ewindup.info/>).

Os níveis de expressão dos genes candidatos foram calculados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Esse método calcula o nível de expressão relativa de um gene a partir dos Cqs dos genes alvo, normalizados com os valores de Cq de genes endógenos, em relação ao calibrador. O calibrador utilizado foram os valores obtidos de *P. capitalensis* para os genes expressos na espécie patogênica e *P. citricarpa* para os genes expressos na espécie endofítica. O calibrador é o valor de obtido para uma amostra específica. A variação dos níveis de expressão das amostras de interesse são obtidos em relação ao normalizador (Livak & Schmittgen, 2001; VanGuilder *et al.*, 2008). As médias das três repetições biológicas de cada amostra com os diferentes genes analisados foram comparadas aplicando o teste t ($P \leq 0.05$).

Para a seleção dos normalizadores, genes comprovadamente com função constitutiva foram selecionados. As sequencias desses candidatos foram obtidas no GenBank e utilizadas para encontrar regiões conservadas dessas sequencias entre as duas espécies. Foram desenhados *primers* para os genes 18s rRNA, 28s rRNA, *Translation elongation factor* e *Glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase* (Tabela 1).

Tabela1: Genes candidatos para controle endógeno

Gene	Sequencias dos <i>Primers</i>	
18S rRNA	18S1	F-TCTCTTCTGGTTCTGGCATCG R-TTGAAATGACGCTCGAACAG
	18S2	F-GACGTGCGGTCCTATTTTGT R-AACATCCTTGGCAAATGCTT

<i>Translation elongation factor</i>	Tef1	F-GCCTCACATTTTCTTTGAGC R-GCCAAAGCAGCTTAGCGTAG
28S rRNA	28S	F-AGGTGTCGGGAATGTAGCAC R-TTACAACCATTACGCCAGCA
<i>Glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase</i>	GPD	F-AAGGCCTCTGCTCACTTGAA R-CAAGAAGCGTTGGAGAGGAC

As análises para a seleção dos genes normalizadores foram feitas através do algoritmo geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002). Esse programa determina o fator de estabilidade do gene (M), qual é definido através da avaliação da média de variação aos pares ('pairwise variation') de um gene comparando os demais genes candidatos. O baixo valor de M (m-value) demonstra uma alta estabilidade do gene normalizador. O número de genes normalizadores pode variar para distintos conjuntos de amostras. Este valor também pode ser calculado pelo *software* por meio do cálculo dos *pairwise variation* entre cada combinação sequencial de fatores de normalização (NF). Vandesompele e colaboradores propuseram 0,15 como *m-value* máximo aceitável, acima do qual, a inclusão de um gene endógeno não resulta em melhora da normalização (Artico *et al.*, 2010; Vandesompele *et al.*, 2002).

Complementarmente, foi analisada a expressão de genes candidatos envolvidos na patogenicidade de diversos fungos em *P. citricarpa* e *P. capitalensis*.

Genes com função patogênica em diversos fungos foram selecionados por meio de revisão bibliográfica e suas sequências foram obtidas no GenBank. Essas sequências foram alinhadas com as ORFs de *P. citricarpa* utilizando a ferramenta Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Os *primers* para os genes selecionados foram desenhados nas regiões conservadas compartilhadas entre as espécies estudadas utilizando a ferramenta Primer blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). As penalidades dos *primers* foram verificadas utilizando a ferramenta Primer 3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). Foram desenhados 16 pares *primers* para os genes que apresentaram maior similaridade com as sequências de referência (Tabela 2).

Tabela 2: Genes envolvidos com patogenicidade escolhidos por similaridade com outros fungos fitopatogênicos

	Genes	Sequências de primers	Função
Degradação de parede celular	Cut A	F-AGCCGCTAAAGTCTCTGCTG R-GTGGGGAGGCAGGATAACG	Cutinase envolvida na degradação de parede celular
	Cut 2	F-ATGACGAACCAGGCCAACTC R-CACCTTTGACGCCTTGCTG	Cutinase envolvida no reconhecimento de superfície, diferenciação germinativa, desenvolvimento de apressório, penetração no hospedeiro e virulência
Genes envolvidos em sinalização	BatrB	F-GCTCAAGTACGTCGACACTGTA R-GGATAGAAGGCTTGGAGACGAG	ABC transporter, Efluxo
	MagB	F-GTCGCTCAACCAACATGAGA R-GCACATGATGTAAACATAACCATTGA	Subunidade Alfa de proteína G
	CHK1	F-AAAGCGATTGACGTCTGGAG R-AGGATGAGGGTGAGTTGGTG	MAP quinase envolvida na conidiação, formação de apressório e patogenicidade
Genes envolvidos em estruturas de infecção e penetração	THR1	F-GAGTTTGACCGCGTCTTCAG R-CGAGTAGACGGTGTGCTTGG	Tetrahydroxinafitaleno redutase envolvida na penetração do apressório
	PKs1	F-TCCTCAAGCGTTACGAGGAC R-GTGATGGAGACAGCCTCAGC	Poliketide sintase, biossíntese de melanina
	SDH1	F-AGAAGGTTTTCGGACGACGAG R-TTTGTACCAGTGCGTGTTGG	scytalone desidratase e síntese de melanina
Produção de metabólitos secundários e toxinas	NPS6	F-ACTCCGAGCTGCTCTCATTG R-AACGTCTGAGACCGTGAGACC	Nonribossomal peptide sintase envolvida em fatores de virulência
	NPS2	F-ACTCCGAGCTGCTCTCATTG R-AACGTCTGAGACCGTGAGACC	Envolvido na biossíntese do sideroforo hidroxamato
	AaPEX6	F-ATCTCGACGGCCTACTTCTTC R-GCACTGACGCTGGGTACG	Síntese de peroxissomos, síntese de metabólitos secundários e

		patogenicidade
DEC1	F-ACTTCAACACGACAGGCTTCA R-CCATGCGCTCAGTGATCTTG	Decarboxilase
AOX1	F-ACCCATTCTTCCC GTACGAC R-CGTGATGTTGCTCGACAGGT	Álcool oxidase
HTS1	F-AACCAAAACTCGGTCCAGGAA R-GGCGCTAATGCTATCAAGACC	Peptideo sintetase catalizador da produção da toxina HC
ToxF	F-GCGTCTATGTCATGCCCACT R-AGCACTGGGGCATAGTTTCC	Aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada
ToxC	F-GACAGCGAGTGGGAAAAGACT R-AGCCTTGTCGAGAGCGAAG	Sub unidade beta de sintetase de ácido graxo envolvida na síntese de Toxina HC

A especificidade dos primers e a validação dos genes foram realizadas como descrito a cima para os genes utilizados para validação do sequenciamento transcriptômico.

5. Resultados e Discussão

5.1 Sequenciamento genômico

5.1.1 Dados gerais

Após a extração, foi possível visualizar a boa qualidade dos DNAs de ambas as espécies de fungos em gel de agarose 0,8% (Figura 4). Dez microgramas de DNA de cada fungo foram enviadas para a empresa Macrogen para a realização do sequenciamento genômico.

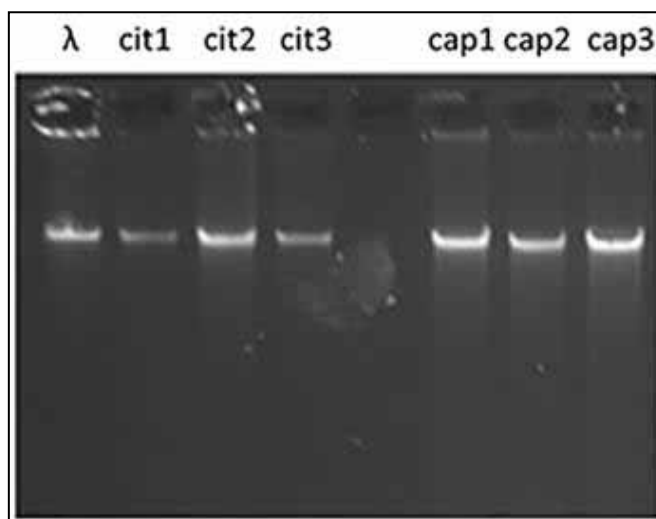


Figura 4: Qualidade das amostras de DNAs em gel de agarose 0,8%. Lambda (λ) 100 ng/ μ l; Cit1, Cit2, Cit3, correspondem às três repetições biológicas amostras de *P. citricarpa*; Cap1, Cap2, Cap3 correspondem às três repetições biológicas das amostras de *P. capitalensis*.

Como resultado do sequenciamento, foram obtidas 18.167.942.216 bases e 179.880.616 de *reads* para *P. citricarpa*, enquanto que para *P. capitalensis* foram gerados 15.031.933.020 de bases e 148.831.020 de *reads*. O conteúdo CG foi de 48,72% e 51,43% para a espécie patogênica e endofítica, respectivamente. A qualidade das sequências com Phred ≥ 20 (Q20) foi superior a 90% para ambas as espécies (Tabela 3).

Os *reads* das duas espécies foram usados para a montagem *de novo* do genoma. Foi gerado um genoma com aproximadamente 32.6 Mb distribuídos em 19.143 *contigs* para *P. citricarpa* e 33.2 Mb em 11.080 *contigs* para *P. capitalensis*. O N50 foi de 3.049 para *P. citricarpa* e 4.925 para *P. capitalensis*, esse valor (N50) significa que 50% das bases

montadas estão em *contigs* de tamanho N ou maiores (Miller, Koren, & Sutton, 2010)(Tabela 4).

Tabela 3: Características gerais do sequenciamento genômico de *P. citricarpa* e *P. capitalensis*.

Espécie	Total de Bases	N° de reads	Conteúdo CG (%)	Q20 (%)
<i>P. citricarpa</i>	18.167.942.216	179.880.616	48,72	93,52
<i>P. capitalensis</i>	15.031.933.020	148.831.020	51,43	91,63

Com o tamanho estimado do genoma por Glienke (1999) tornou-se possível verificar a profundidade de cobertura de sequenciamento realizado. As tecnologias de NGS baseadas em PCR, como a utilizada nesse trabalho, geram milhares de cópias dos fragmentos contidos nas bibliotecas gênicas durante o sequenciamento. A profundidade da cobertura de sequenciamento consiste na quantidade de vezes que os fragmentos em questão, no caso todo o genoma, foram sequenciados.

Estimamos uma cobertura de 779.2x para *P. citricarpa* e 643.3x para *P. capitalensis* (Tabela 4). No período em que o estudo de Glienke foi realizado, *P. citricarpa* e *P. capitalensis* eram consideradas cepas patogênicas e não patogênicas da mesma espécie, ambas denominadas *Guignardia citricarpa* (nomenclatura dada à fase sexual de *P. citricarpa* até 2012). Anos depois, a cepa não patogênica foi reclassificada como uma nova espécie, *P. capitalensis* (Baayen *et al.*, 2002).

Embasada nos trabalhos anteriores, Silva (2008) reproduziu a técnica de eletroforese de campo pulsado para estimar o número de cromossomos de *P. citricarpa*, *P. capitalensis* e *Phyllosticta spinarum*. Nesse estudo considerou-se 21,5Mb como sendo o tamanho do genoma de *P. capitalensis*. Apesar de estimar o número de cromossomos, o tamanho do genoma das espécies não foi estimado nesse trabalho.

Após a montagem dos *contigs*, as sequências das espécies foram submetidas à predição das ORFs através do programa Augustus. Foram preditas 16.267 ORFs para a espécie patogênica e 14.813 para a espécie endofítica (tabela 4).

Atualmente, os genomas dessas espécies encontram-se em processo de categorização dos genes por meio do programa Blas2go.

Tabela4: Montagem *de novo* para as espécies *P. citricarpa* e *P. capitalensis*.

	<i>P. citricarpa</i>	<i>P. capitalensis</i>
Tamanho estimado do genoma (Mb)	32.6	33.2
N° contigs	19.143	11.080
N50 -contigs	3.049	4.925
N° de ORFs	16.267	14.813
Cobertura do sequenciamento	779.2 X	643.3X

5.1.2 Enriquecimento de vias pelo KEGG

KEGG é um banco de dados que integra informações genômicas e funcionais. Esse banco de dados apresenta informações de genomas completos e parciais que consistem na anotação e diversas funções de cada gene. A ferramenta de anotação de genes e genomas disponível nesse banco de dados é amplamente utilizada, pois proporciona além da categorização, a representação gráfica dos processos celulares como metabolismo, ciclo celular, transdução de sinal, entre outros, em que os genes estão envolvidos (Kanehisa & Goto, 2011; Kanehisa *et al.*, 2012; Mao *et al.*, 2005).

Análise preliminar dos genomas de *P. citricarpa* e *P. capitalensis* foi realizada utilizando a ferramenta KEGG. No entanto, aproximadamente somente 20% das ORFs das duas espécies foram categorizadas pelo programa. (Tabela anexo 01). Os resultados obtidos permitiram identificar algumas diferenças interessantes entre as espécies.

5.1.2.1. *Metabolismo geral*

Foram observadas quantidades maiores de genes envolvidos com metabolismo de carbono e biossíntese de aminoácidos em *P. citricarpa* quando comparada à *P. capitalensis* (Figura 1, 2, 3 e 4 anexo; Tabela 02 anexo). Soanes e colaboradores (2008) postularam que enzimas envolvidas em vias essenciais a todos os fungos, como enzimas envolvidas na beta-oxidação, síntese e ácidos graxos, metabolismo de aminoácidos e utilização de açúcares estocados, são importantes para a patogenicidade. Os autores acreditam que quando essas vias são consideradas em conjunto elas podem representar o estado nutricional fúngico requerido para os estágios iniciais de infecção e nutrição no tecido hospedeiro. Reduções em famílias gênicas envolvidas em metabolismo primário e secundário foram observadas em *Piriformospora indica*, indicando que essa espécie necessita obter esses compostos a partir do hospedeiro para seu completo desenvolvimento (Zuccaro *et al.*, 2011). Análises

bioinformáticas demonstraram que o fungo biotrófico *Blumeria graminis* apresenta menores quantidades de genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos (Giles *et al.*, 2003). Os autores atribuíram essa redução ao estilo de vida do fungo que provavelmente utiliza a maquinaria hospedeira para obtenção de aminoácidos.

Como relação a genes envolvidos com metabolismo secundário, as duas espécies apresentam quantidade de genes semelhantes, assim como quantidades parecidas de genes envolvidos com o metabolismo e degradação de xenobióticos (Tabela 03, anexo).

P. capitalensis apresentou mais genes envolvidos na degradação e síntese de limoneno e genaniol (tabela 4 anexo). Terpenos, como limoneno e geraniol são os principais metabólitos secundários das plantas. Varma e colaboradores (2013) demonstraram que o fungo endofítico *Piriformospora indica* aumenta a quantidade de metabólitos envolvidos na síntese de ubiquinona e degradação de limoneno e pinene em resposta à rizobactéria *Burkholderia cepacia* sugerindo que esses metabólitos estão envolvidos em processos de biorremediação e interação planta-microrganismo. Em contra partida, a espécie patogênica apresentou maior quantidade de genes envolvidos com a síntese de aflatoxinas, tetraciclina e flavonol (tabela anexo 03).

5.1.2.2. Vias de sinalização

De forma geral, as duas espécies apresentam quantidade similares de genes envolvidos em diversas vias de sinalização (tabela 05 anexo). Foi observado um número maior de genes envolvidos com a via de sinalização de cálcio na espécie endofítica (Figura 5 anexo), bem como duas proteínas quinases dependentes de cAMP (PKA), contra apenas uma a espécie patogênica (tabela 05 anexo). As vias de sinalização de cálcio são conservadas em fungos e a quantidade de cópias de genes pode variar entre espécies (Eaton *et al.*, 2011). Essas vias são descritas como importantes na comunicação entre o microrganismo simbiote e a planta hospedeira atuando nos processos iniciais de infecção e nodulação (Dodd *et al.*, 2010; vadassery & Oelmüller, 2009). As PKAs, são as proteínas centrais da via de sinalização dependente de cAMP sendo essencial em processo de crescimento e desenvolvimento (Eaton *et al.*, 2011). A via de sinalização cAMP é requerida para o processo infeccioso de diversos fungos fitopatogênicos. A interferência em genes que codificam PKA promoveram a redução de virulência em diversos fungos como *M. grisea*, *Fusarium verticillioides* e *U. maydis* (Kahmann *et al.* 1999; Choi & Xu 2010; Klimpel *et al.* 2002).

5.1.2.3. Genes envolvidos com patogenicidade ou simbiose

Foi observado um número menor de genes que codificam para transportadores ABC na espécie endofítica em relação a espécie patogênica. (Figuras 6 e 7 anexo). Transportadores ABC estão envolvidos no deslocamento de diversas substâncias, entre elas, toxinas produzidas pelo patógeno e pelo hospedeiro, contribuindo para a virulência e auxiliando o fungo a se desintoxicar de produtos produzidos pela defesa da planta (Howlett, 2006). Essa família gênica foi descrita por Aguilera e colaboradores (2008) como uma das famílias em expansão no reino fúngico, provavelmente essa expansão deve ser mais evidente em genomas de fungos fitopatogênicos uma vez que essas espécies estão mais expostas a respostas de defesa hospedeira. Corroborando os dados observados, análise genômica da espécie endofítica *P. indica* também apontou diminuição na quantidade de genes dessa família gênica (Zuccaro *et al.*, 2011).

Quantidades semelhantes de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação de parede celular vegetal foram identificadas nas duas espécies (Tabela 5; tabela 06, anexo), assim como pectato liase e pectina esterase, enzimas envolvidas na degradação da pectina, foram observadas nas duas espécies, (Tabela 5; tabela 06, anexo) demonstrando que as duas espécies apresentam capacidades similares de degradação da parede celular do hospedeiro. No entanto, *P. citricarpa* apresenta três vezes mais quitinases do que *P. capitalensis*. Tais enzimas são responsáveis pela degradação de quitina e geralmente estão envolvidas em processos de autólise no qual o fungo realiza a digestão de hifas velhas (Hartl *et al.*, 2012). Uma hipótese para a identificação desses genes é a tentativa dessa espécie de reduzir quitinoligossacarídeos que são reconhecidos pelo hospedeiro e desencadeiam resposta de defesa (Amselem *et al.*, 2011).

Tabela 5. Quantidades de genes anotados que codificam enzimas hidrolíticas categorizadas em *P. citricarpa* e *P. capitalensis*.

Genes candidatos	<i>P. citricarpa</i>	<i>P. capitalensis</i>
alpha-amylase	3	3
endo-1,4-beta-xylanase	1	1
glucan 1,4-alpha-glucosidase	1	2
endoglucanase	4	1
endo-1,3(4)-beta-glucanase	1	2
alpha-glucosidase	4	2
beta-glucosidase	7	7
alpha-galactosidase	1	1
beta-galactosidase	1	1
alpha-mannosidase	2	2

beta-mannosidase	3	2
Quitinase	9	3

A identificação de genes que codificam fosfatases que respondem a diferentes tipos de pH podem elucidar algumas mudanças substanciais no estilo de vida de *P. citricarpa* e *P. capitalensis*. Foi identificado que a espécie endofítica apresenta mais fosfatases ácidas do que alcalinas (Tabela 07, anexo). Isso é um indício de que diversas enzimas dessa espécie, quais são utilizadas na obtenção de nutrientes, requerem um ambiente ácido para se tornarem ativas. Em contra partida, *P. citricarpa* apresenta quase a mesma quantidade de fosfatases alcalinas e ácidas o que sugere que essa espécie adequa a secreção de suas enzimas de acordo com o pH do ambiente (Manteau *et al.*; 2003; Alkan *et al.*, 2012).

5.2 Análise do transcriptoma

5.2.1 Dados Gerais

Após a extração, foi possível visualizar a boa qualidade dos RNAs de ambas as espécies de fungos através do “RNA Nano Labchips” no aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) (Figura 5). Dez microgramas de DNA de cada fungo foram enviadas para a empresa Macrogen para a realização do sequenciamento genômico.

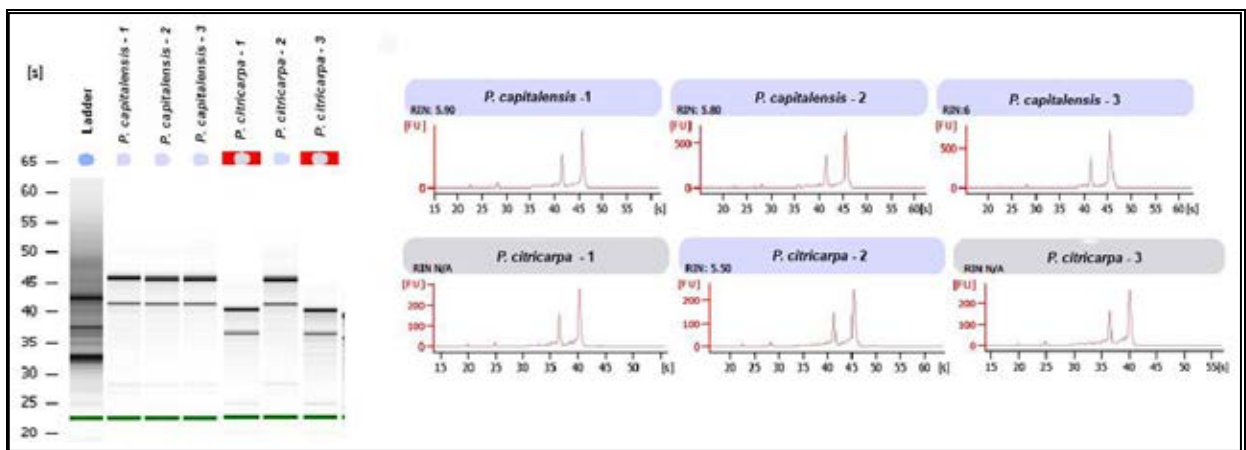


Figura 5. Concentração e a integridade dos RNAs avaliadas em “RNA Nano Labchips” no aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) demonstrada através de gráficos, onde cada um é referente a uma amostra que também é representada em gel. Amostras *P. capitalensis* 1 a 3, correspondem ao RNA das replicas biológicas de *P. capitalensis* e as amostras *P. citricarpa*. 1 a 3 correspondem ao RNA das replicas biológicas de *P. citricarpa*.

A análise de RNA-seq gerou em média 74 milhões de *reads* por repetição biológica para ambas as espécies (Tabela 6). Após a análise no programa Cufflinks foram obtidos 3,074 transcritos diferencialmente expressos, com valores de fold ≤ 2 , sendo 2,637 mais expressos em *P. citricarpa* e 1.097 em *P. capitalensis* (tabela 08, anexo).

Tabela 6. Número de *reads* de transcriptoma gerados por RNA-seq de *P. citricarpa* e *P. capitalensis*.

Espécie	Repetições Biológicas	Nº de <i>reads</i> sequenciados
<i>P. capitalensis</i>	1	77.265.680
	2	74.021.134
	3	68.074.552
<i>P. citricarpa</i>	1	76.999.094
	2	76.596.154
	3	71.154.164

5.2.2 Categorização pelo programa Blast2go

Após a categorização dos genes diferencialmente expressos pelo programa Blast2go, foi verificado que a maioria das sequências mapeadas apresentou similaridade com as espécies *Macrophomina phaseolina* e *Neofusicoccum parvum* (Figuras 6 e 7). *Macrophomina phaseolina* é um ascomiceto pertencente à família Botryosphaeriaceae que apresenta ampla distribuição geográfica. *M. phaseolina* é um fungo necrotrófico que apresenta uma ampla gama de hospedeiros, causando a prodrisão do carvão em mais de 500 plantas hospedeiras, incluindo diversas culturas comercialmente importantes como milho, soja sorgo, feijão, alfafa, entre outros (Islam *et al.*, 2012). Pertencente à mesma família de *M. phaseolina*, *N. parvum* também apresenta ampla distribuição geográfica, e é patógeno de diversas plantas lenhosas. *N. parvum* um patógeno latente que possui estágios de vida semelhante a fungos endofíticos (Sakalidis, 2011).

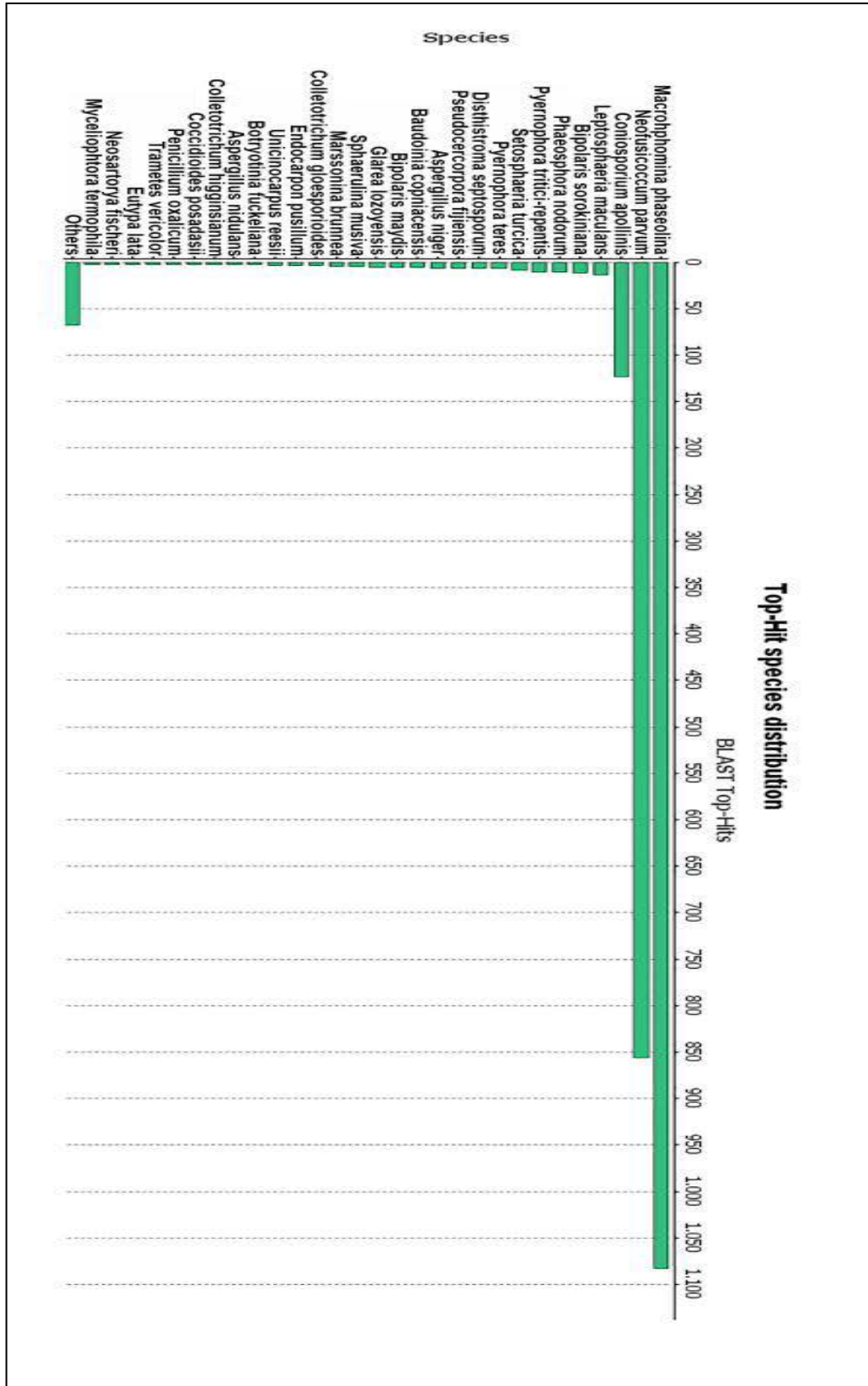


Figura 6. Distribuição dos alinhamentos realizados entre as sequencias de *P. citricarpa* diversas espécies realizada automaticamente pelo programa Blas2go.

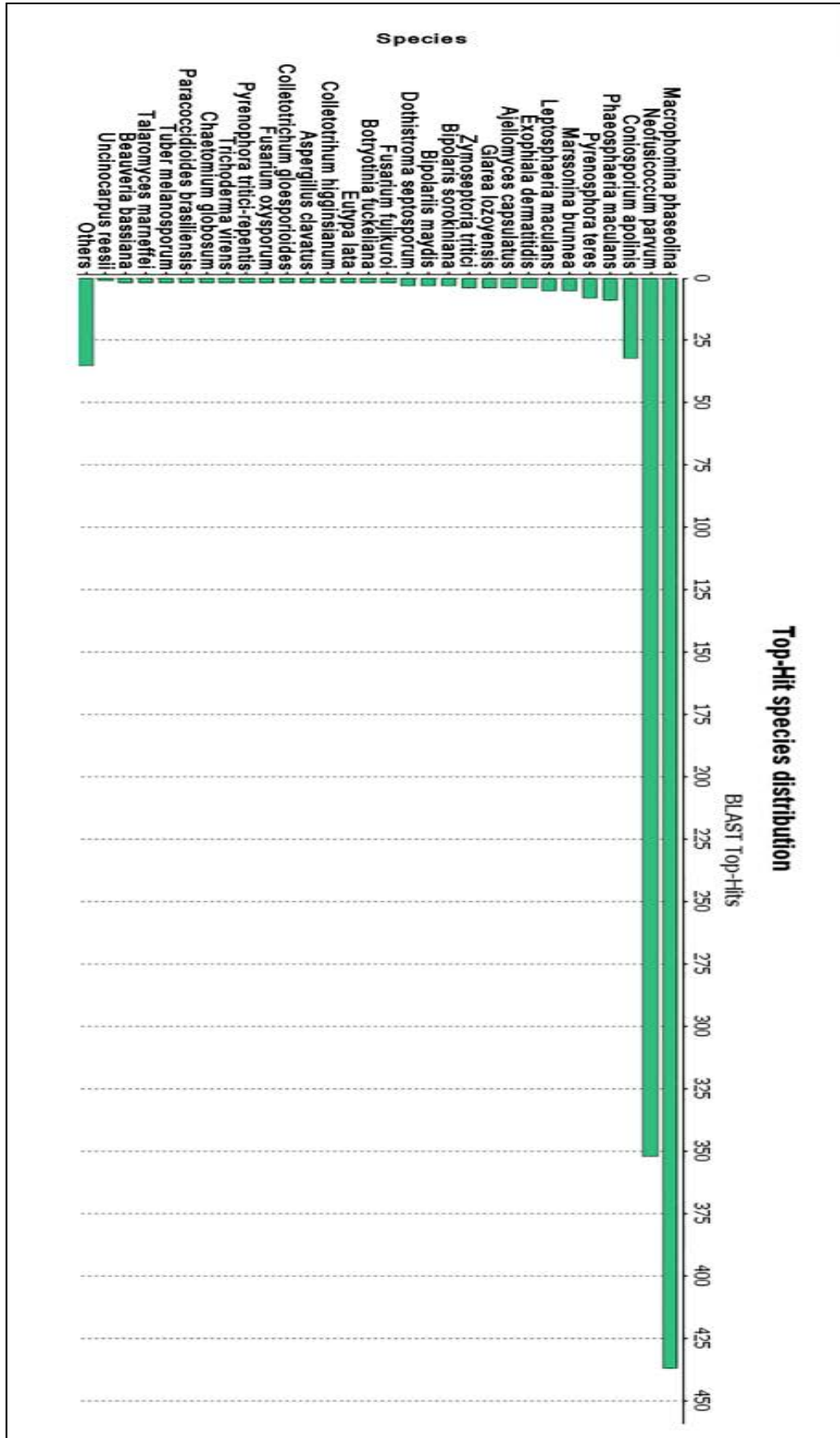


Figura 7. Distribuição dos alinhamentos realizados entre as sequencias de *P. capitalensis* diversas espécies realizada automaticamente pelo programa Blas2go.

O programa Blast2Go utiliza bancos de dados públicos para a categorização dos genes. Em seguida, os genes são classificados de acordo com sua função em três categorias: Processos biológicos, função molecular e componente celular. Vale apenas ressaltar que as categorias podem se sobrepor, ou seja, um gene pode ser encontrado em uma ou mais categorias.

Na categoria de processos biológicos foi observado que *P. citricarpa* concentra a maioria dos seus genes expressos em processos metabólicos e celulares (Figura 8). *P. capitalensis* também apresenta as categorias processos celulares e metabólicos com a maior quantidade de genes (Figura 8).

No entanto, ao comparar *P. citricarpa* à *P. capitalensis* algumas diferenças que podem ser relevantes para o estilo de vida desses fungos são observadas como o aparecimento de dois grupos gênicos que não são encontrados na espécie patogênica: sistema imune e adesão biológica (Figura 8).

Na categoria sistema imune o gene categorizado codifica uma proteína de fusão ubiquitina-ribossomal (*ribosomal-ubiquitin fusion protein*) (GO:0097190) segundo a anotação do *Gene ontology* envolvida em processos de apoptose (Tabela 09, anexo).

A adesão é um processo importante para a infecção fúngica. Muitos fungos apresentam uma mucilagem que recobre os seus esporos facilitando a fixação deste no tecido hospedeiro e auxiliando assim no contato inicial (Tudzynski, & Sharon, 2003). As duas espécies aqui estudadas apresentam mucilagem recobrindo os esporos (Glienke, *et al* 2011), o que demonstra que a adesão do esporo ao hospedeiro é um fator limitante a infecção desses fungos. Após a germinação dos esporos, o fungo estimula a secreção de mucilagens que auxiliem a adesão do tubo germinativo e do apressório no hospedeiro. Durante essa fase diversas proteínas auxiliam o desenvolvimento dessas estruturas e medeiam a sinalização inicial entre planta e fungo (Tudzynski, & Sharon, 2003). Os genes identificados em *P. capitalensis* na categoria adesão biológica codificam reguladores transcricionais medusa (GO:0044406, GO:0048315). Segundo a categorização do Gene ontology (geneontology.org) esses genes estão envolvidos em processo de infecção, adesão do esporo ao hospedeiro e são importantes para a implantação da interação simbiótica.

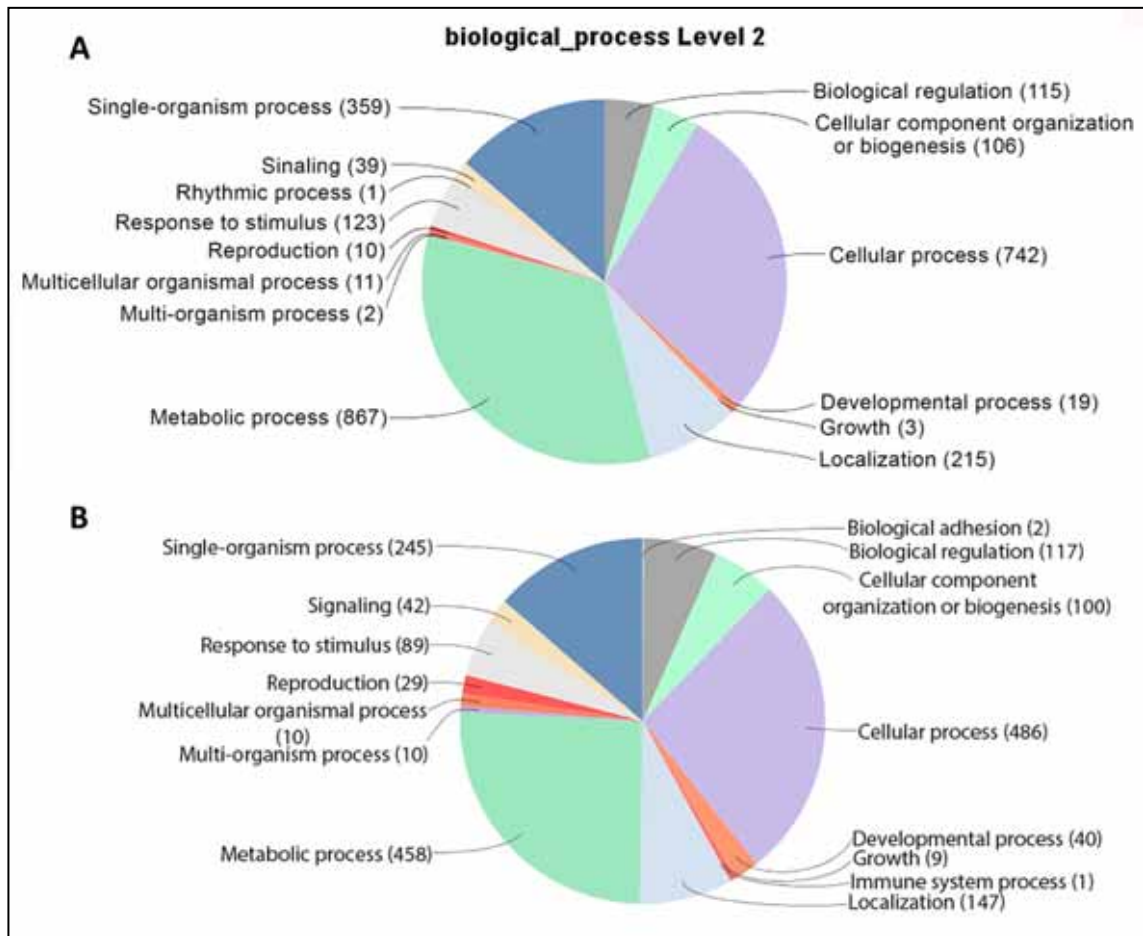


Figura 8. Categorização dos genes expressos em *P. citricarpa* (A) e *P. capitalensis* (B). Os genes foram categorizados automaticamente de acordo com GO (Gene Ontology) e distribuídos conforme o processo biológico em que o gene está envolvido.

Além do aparecimento das categorias sistema imune e adesão biológica, pode-se observar que a espécie endofítica apresenta uma quantidade muito maior de genes envolvidos com vias de sinalização (42 genes) em relação à espécie patogênica (29 genes) (Figura 8).

A forma como a planta e o microrganismo se reconhecem e respondem a estímulos é essencial para determinação do tipo de interação: simbiótica ou patogênica. De forma geral, os eventos de sinalização que atuam na interação entre plantas e microrganismos simbióticos e patogênicos são similares, ativando as mesmas vias de sinalização. No entanto, os mecanismos de reconhecimento pelo hospedeiro que resultam na interação benéfica entre planta e fungo ainda não são bem esclarecidos (Vadassery & Oelmüller, 2009).

As vias de transdução de sinal envolvidas na interação patógeno-planta mais caracterizadas são as vias das proteínas-G, MAPK e cAMP. No entanto, essas vias também estão envolvidas em outros processos fisiológicos importantes no desenvolvimento e sobrevivência fúngica de forma geral.

As proteínas-G estão envolvidas na regulação da transdução de sinais ambientais para células eucarióticas. A via de sinalização regulada por essas proteínas é formada por receptores, responsáveis pela percepção do sinal, que se ligam a essas proteínas formando as subunidades $G\alpha$, $G\beta$ e $G\gamma$. O sinal recebido pelos receptores é transmitido através das proteínas-G para as fosfolipases, proteínas quinase A dependente de cAMP (PKA) e MAPK, que ativam as vias de sinalização MAPK e cAMP (Yu *et al.*, 2008).

P. capitalensis apresentou maior quantidade de genes que codificam proteínas -G do que *P. citricarpa* (Tabela 09, anexo). Três dos quatro genes que codificam para proteínas-G mapeados na espécie endofítica foram caracterizados como $G\alpha$. Essa subunidade é o primeiro componente da cadeia de sinalização e está envolvida no desenvolvimento vegetativo, sexual e em processos de interação planta-patógeno e virulência de fungos fitopatogênicos (Aly *et al.*, 2011; Gronover, *et al.*, 2001). Três proteínas quinase A dependente de cAMP (PKA) foram identificadas em *P. capitalensis* (GO:0005952, GO:0016301, GO:0005952) e uma em *P. citricarpa* (Tabela 09, anexo). Proteínas PKAs são responsáveis pela transdução de sinal na via cAMP e interagem com as proteínas-G (Tudzynski & Sharon, 2003).

A via cAMPK frequentemente interage com a via das proteínas MAP quinases. Um grupo de proteínas quinase serina/treonina altamente conservadas em eucariotos, que assim como a via cAMP, estão envolvidas na transdução de uma grande variedade de sinais extracelulares, regulação de processos de crescimento e diferenciação (Kim *et al.*, 2000; Perotto & Baluska, 2012).

Na espécie endofítica foram expressos três genes envolvidos com as vias de sinalização MAPK (GO:0000165, GO:0000909, GO:0004674), ao passo que a espécie patogênica não apresentou nenhum gene envolvido com essa via (Tabela 09, anexo). Estudos demonstraram que essas vias de sinalização são importantes para a determinação do estilo de vida endofítico, nos quais a deleção ou inativação de genes dessas vias levaram a expressão de características patogênicas em fungos endofíticos (Eaton *et al.*, 2010; Hamel *et al.*, 2012).

Atividade catalítica e ligação foram os grupos mais representativos nas duas espécies na categoria funções moleculares. *P. capitalensis* apresentou um gene envolvido com reserva nutricional, categoria não encontrada na espécie patogênica, além de um maior número de genes envolvidos com atividade molecular estrutural em relação à *P. citricarpa* (Figura 9).

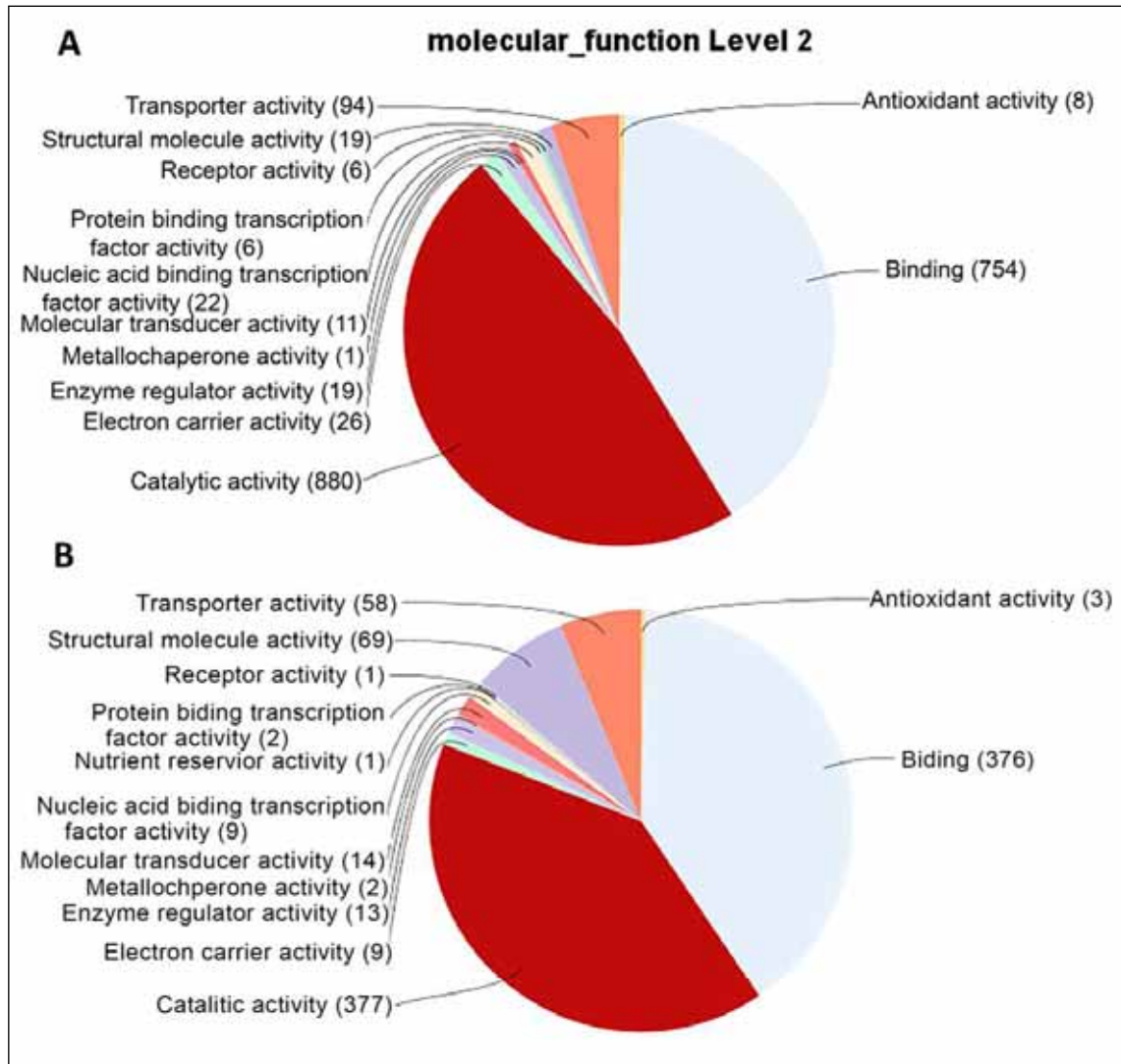


Figura 9 Categorização dos genes expressos em *P. citricarpa* (A) e *P. capitalensis* (B). Os genes foram categorizados automaticamente de acordo com GO (Gene Ontology) e distribuídos conforme a função molecular em que o gene está envolvido.

O terceiro maior grupo em *P. citricarpa* foi o dos genes envolvidos no transporte (Figura 9). Os fungos possuem uma vasta quantidade de transportadores que medeiam a secreção e importação de uma variedade de compostos. Transportadores MFS (*major facilitator superfamily transporter*) estão envolvidos no transporte de solutos, carboidratos, proteínas e, juntamente com os Transportadores ABC (*ATP-binding cassette transporter*), são responsáveis pelo deslocamento de agentes tóxicos exógenos e endógenos ao fungo (Cornell *et al.*, 2007; Del Sorbo *et al.*, 2000).

Foi observada a expressão de grande número de genes que codificam transportadores ABC e MFS, principalmente na espécie patogênica (Figura 10; tabela 10, anexo). Dentre

esses genes, foram identificados nove genes que codificam transportadores multidrogas na espécie patogênica e dois na espécie endofítica (Tabela 10, anexo).

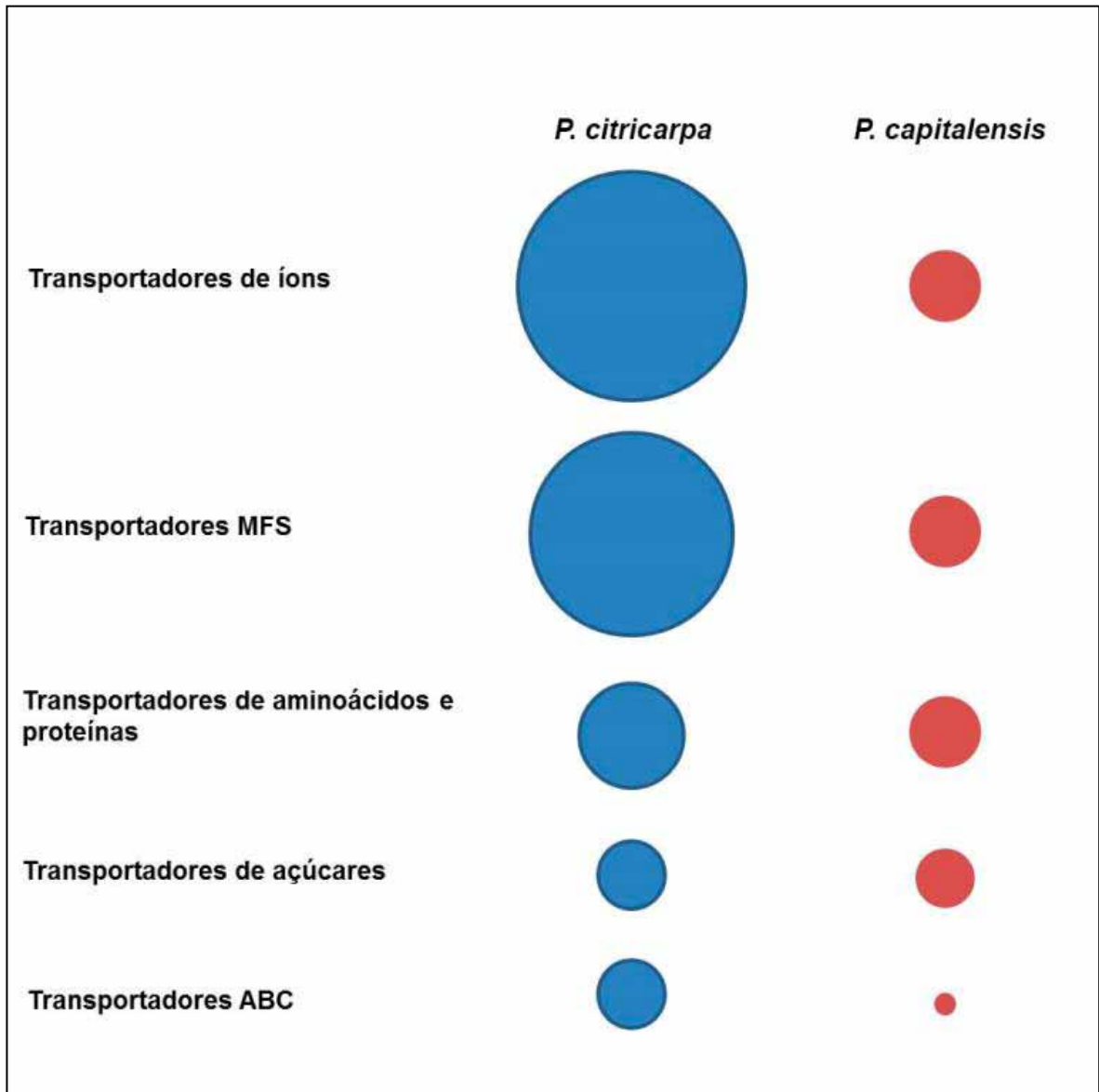


Figura 10. Principais categorias gênicas de transportadores expressos em *P. citricarpa* e *P. capitalensis*. Os diâmetros das circunferências correspondem ao número de genes encontrados em cada categoria.

Diversos estudos evidenciaram a importância dos transportadores multi-drogas para a patogenicidade de fungos (Coleman *et al.*, 2011; Del Sorbo *et al.*, 2000). Tais trabalhos demonstraram que várias toxinas ativam a expressão dos genes que codificam esse tipo de transportadores (Del Sorbo *et al.*, 2000). A interrupção desses genes alterou a capacidade do fungo *Cercospora nicotiana* de penetrar na planta hospedeira, sintetizar e secretar compostos tóxicos (Choquer *et al.*, 2007; Urban *et al.*, 1999). Transportadores ABC foram relatados como responsáveis pela resistência a diversos anti-fungicos em *Candida albicans*,

Cryptococcus neoformans e *Candida glabrata* (Sanglard *et al.*, 1997; 1999; Posteraro *et al.*, 2003;). Além desses transportadores, foram identificados genes que codificam proteínas de resistência a multidrogas nas duas espécies (GO:0055085 em *P. citricarpa* e GO:0042626 em *P. capitalensis*).

A aquisição de resistência a diversos compostos anti-fúngicos por *P. citricarpa* foi relatado em múltiplos trabalhos (Agostini & Peres, 2006; Hendricks, 2013; Possiede & Gabardo, 2009; Schutte & Mansfield, 2003), provavelmente as proteínas multidrogas aqui identificadas apresentam alguma relação com a indução de resistência nessa espécie.

Um baixo número de genes que codificam transportadores ABC foram expressos na espécie endofítica (Figura 10; Tabela10, anexo). É possível que essa espécie apresente uma expressão mais tardia desses genes, como foi verificado em *Piriformospora indica*, cuja expressão desses genes que codificam transportadores ABC foi mais evidente aos 14 dias após a inoculação do fungo em *Arabidopsis thaliana* (Lahrman *et al.*, 2013).

Um grande número de genes que codificam transportadores de íons metálicos e solutos foi expresso em *P. citricarpa* (Figura 10). Íons metálicos são essenciais para o funcionamento celular atuando como cofatores de diversos processos metabólicos. As concentrações de iônicas citoplasmáticas precisam ser finamente reguladas para que o funcionamento da célula não seja comprometido (Saier- Jr, 2000). Nesse sentido, a manutenção de homeostase celular depende do funcionamento eficiente de transportadores e de canais iônicos. Os transportadores encontrados em maior quantidade em *P. citricarpa* foram os responsáveis pelo deslocamento de sódio, potássio, ferro e cálcio (Figura 11).

Transportadores de sódio e potássio frequentemente estão relacionados com a manutenção do pH intracelular e do gradiente iônico da membrana plasmática (Rodríguez-Navarro & Benito, 2010; Benito *et al.*, 2011). Em fungos e leveduras o cálcio modula uma série de cascatas de sinalização importantes para a simbiose e patogênese. Mutantes deletérios de genes envolvidos no transporte de cálcio apresentaram má formação em conídios e apressórios, no entanto, a ação da ausência desses genes na patogenicidade diverge entre espécies. A mutação em genes que codificam canais de cálcio em *Botrytis cinerea* não promoveu ausência de patogenicidade (Harren & Tudzynski, 2013). Em contra partida, efeitos na virulência foram evidenciados em mutantes deletérios de *Claviceps purpurea* para gene que codifica canais iônicos (Bormann & Tudzynski, 2009).

Os íons metálicos podem ser divididos em dois grupos: íons redox ativos como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} e não ativos como Ca^+ e Zn^{2+} . Os íons ativos geralmente compõem enzimas com função em atividade redox e são importantes na conversão de componentes que contenham

oxigênio ativo. Dentre esses íons ativos, o ferro destaca-se, pois é um cofator indispensável de uma variedade de processos celulares como transporte de íons, biossíntese de esteróis, metabolismo de aminoácidos. Além disso, o excesso de íons de ferro livre pode catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Haas, 2012), o que pode ser importante para fungos fitopatogênicos, principalmente para a virulência de fungos necrotróficos. Nesse sentido, transportadores de ferro são importantes para a manutenção da homeostase e desintoxicação celular e na aquisição de ferro.

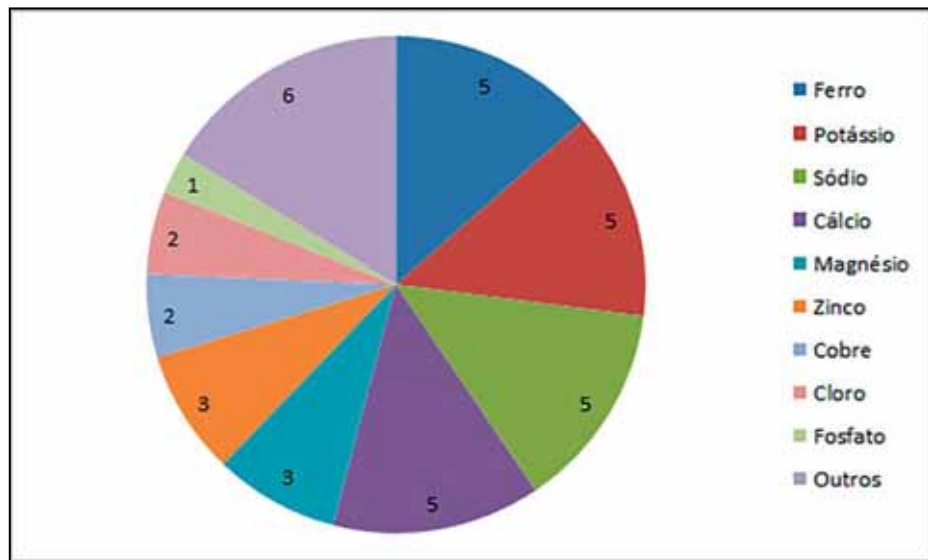


Figura 11. Genes que codificam para transportadores de íons metálicos em *P. citricarpa*.

Outro resultado interessante foi a identificação de dois genes que codificam proteínas de efluxo de auxina em *P. citricarpa* (GO:0055085). Auxina é um importante fitormônio, que atua em diversos processos de desenvolvimento da planta. Alguns microrganismos associados a plantas (fungos e bactérias) apresentam a capacidade de sintetizar diversos fitormônios, ou manipula a produção desse hormônio pela planta hospedeira em seu favor. Estudos demonstram que a síntese desses hormônios vegetais é importante para o processo infeccioso de diversos fitopatógenos (Tudzynski & Sharon, 2002; Walbot & Skibbe, 2010). Em infecções causadas por bactérias, a elevação dos níveis de auxina promove a formação de tumores, a deformação de órgãos e epinastia (Tudzynski & Sharon, 2002). Há indícios de que fungos fitopatogênicos utilizem auxina para estimular a proliferação celular e o deslocamento de fotoassimilados de regiões saldáveis para regiões infectadas. Além dos sintomas já citados (Walbot & Skibbe, 2010; Gan *et al*, 2012), há relatos de que elevações nos níveis de auxina pode suprimir diversas respostas de defesa da planta, como respostas hipersensibilidade, e síntese de quitinases em infecções assintomáticas (Tudzynski & Sharon, 2002). Dessa forma,

se pode inferir que o gene expresso em *P. citricarpa* provavelmente atue auxiliando a elevação das concentrações de auxina em pontos de infecção, favorecendo assim, a virulência e o desenvolvimento do fungo no hospedeiro.

Na categoria componentes celulares, a maioria dos genes expressos foi agrupado nas categorias célula e organela para ambas as espécies (Figura 12). Em comparação com a espécie patogênica, *P. capitalensis* apresentou maior número de genes envolvidos com processos macromoleculares.

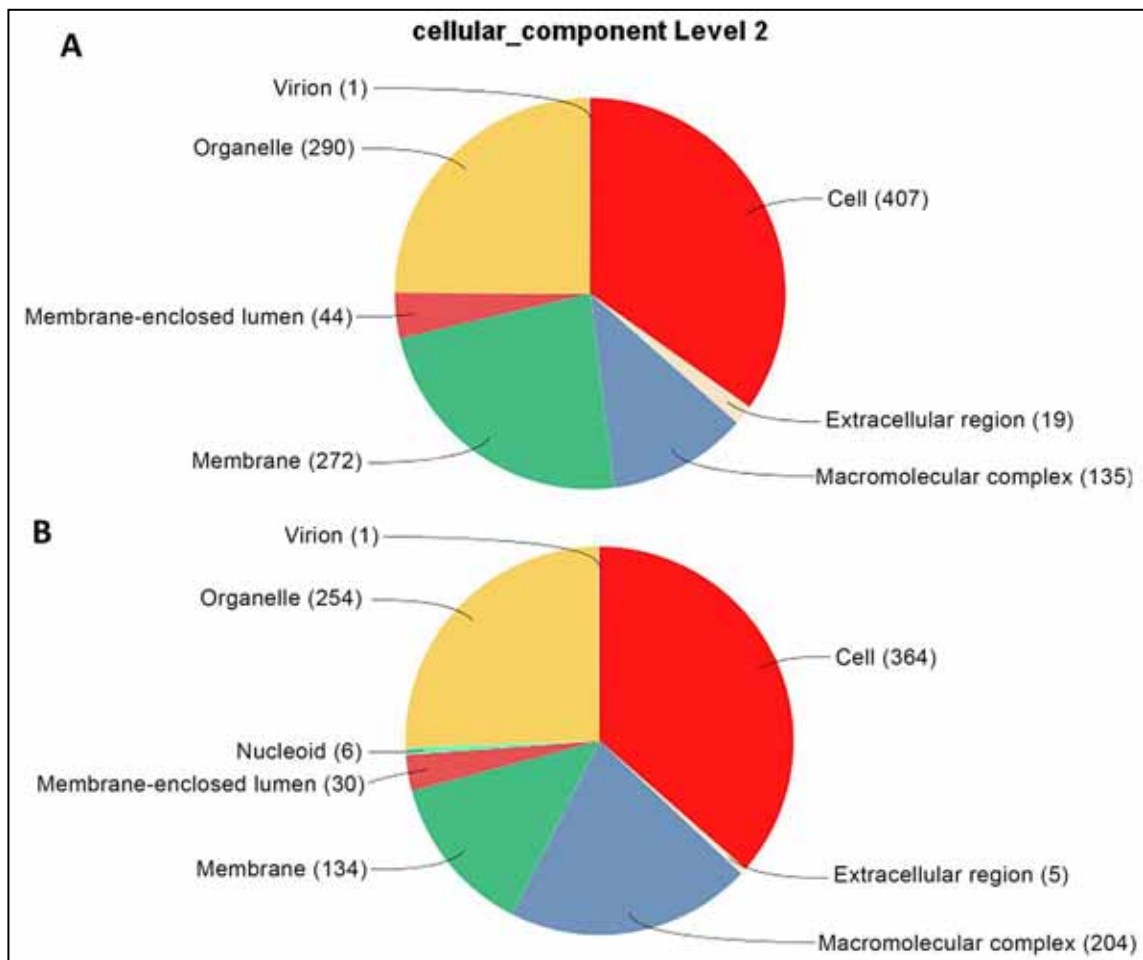


Figura 12. Categorização dos genes expressos em *P. citricarpa* (A) e *P. capitalensis* (B). Os genes foram categorizados automaticamente de acordo com o GO (Gene ontology) e distribuídos conforme o componente celular em que o gene está envolvido.

5.2.2.1 Genes envolvidos na degradação da parede celular

A parede celular vegetal é uma estrutura rígida formada por polissacarídeos (celulose, hemicelulose e pectina), proteínas e lignina, consistindo uma barreira contra a entrada de patógenos. Para superar essa barreira os microrganismos sintetizam uma série de enzimas capazes de degradar essas substâncias (Aro, Pakula, & Penttilä, 2005).

Nesse estudo, *P. citricarpa* apresentou maior expressão de genes envolvidos com a degradação da parede celular em relação a *P. capitalensis*, sendo a classe das enzimas glicosídeo hidrolases (GH) a que apresentou maior número de genes expressos (tabela e anexo). A espécie patogênica apresentou ainda dois genes que codificam para pectato liase, duas pectina esterases e seis genes codificantes para glucanases (Tabela7; Tabela 11, anexo).

Tabela 7. Genes de enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal expressas em *P. citricarpa* e *P. capitalensis*.

Genes	<i>P. citricarpa</i>	<i>P. capitalensis</i>
Pectato liase	2	-
pectinesterase	2	-
Glucanases	6	-
Glicosídeo hidrolases	30	9
Carboidrato Esterase	1	-
Total	41	9

Tais enzimas fazem parte de um grupo de proteínas denominadas enzimas ativas em carboidratos (CAZymes) que atuam na biossíntese quebra e modificação de oligo e/ou polissacarídeos e glicoconjugados. Essas enzimas são classificadas em 4 grupos: Glicosídeo hidrolases (GH), Carboidrato esterases (CE), polissacarídeo liases (PL) e glicosil transferases (GT). Os três primeiros grupos são relatados como degradadores de parede celular vegetal, sendo importantes para a penetração, infecção e nutrição do fungo (Zhao *et al*, 2013).

A quantidade e expressão de genes que codificam essas enzimas e a síntese dessas proteínas são determinadas, entre outros fatores, por adaptações ao meio em que o fungo habita e ao seu estilo de vida (Soanes *et al.*, 2008). Esse fato pode explicar as diferenças na expressão dessas enzimas entre *P. citricarpa* e *P. capitalensis*. A espécie endofítica provavelmente apresenta um comportamento semelhante a fungos biotróficos durante a infecção. Esses fungos parasitam tecidos vivos, por isso, secretam quantidades limitadas de enzimas líticas a fim de danificar o mínimo possível a célula hospedeira. Por outro lado os fungos necrotróficos, como *P. citricarpa*, matam a célula, hospedeira destruído o tecido vegetal requerendo assim uma quantidade maior de enzimas envolvidas na degradação da parede celular do que fungos biotróficos e endofíticos.

As enzimas GH estão envolvidas na degradação de diversos componentes da parede celular como celulose, hemicelulose e pectina. Essas enzimas são classificadas em 127 famílias de acordo com sua especificidade de substrato e seu mecanismo molecular (Cazy.org,

2013). Genes que codificam proteínas de catorze famílias GH envolvidas com a degradação da parede celular vegetal foram expressos nas espécies estudadas. As famílias que apresentaram maior número de genes entre as espécies foram GH3 e GH61 (Tabela 8; Tabela 11, anexo). A família 61 está envolvida na degradação de lignocelulose. A família GH3 é importante para a degradação de celulose (Thakur *et al.*, 2013; Zhao, *et al* 2013). A GH28, família das poligalaturonases, está envolvida na degradação de pectina. Resultados semelhantes foram encontrados em análises transcriptômicas do fungo hemibiotrófico *Venturia inaequalis* que, assim como *P. citricarpa*, afeta principalmente os frutos, causando a fitopatologia sarna-da-maçã (Thakur *et al.*, 2013).

Tabela 8. Genes das famílias de Glicosideo hidrolases (GH) envolvidas na degradação da parede celular vegetal expressos em *P. citricarpa* e *P. capitalensis*.

Famílias GH	Função putativa	<i>P. capitalensis</i>	<i>P. citricarpa</i>
2	β -galactosidase , β -mannosidase	-	1
3	β -glucosidase, xylan 1,4- β -xylosidase	2	5
5	chitosanase, β -mannosidase	1	3
16	Xyloglucosyltransferase, endo-1,3(4)- β -glucanase	2	4
28	polygalacturonase, exo-polygalacturonase	1	3
36	α -galactosidase, α -N-acetylgalactosaminidase	-	1
43	β -xylosidase, α -L-arabinofuranosidase	1	-
47	α -mannosidase	-	2
53	endo- β -1,4-galactanase	-	1
61	Copper-dependent lytic polysaccharide monoxygenases	1	5
78	α L-rhamnosidase	-	1
79	β -glucuronidase, β -4-O-methyl-glucuronidase	-	2
92	mannosyl-oligosaccharide a-1,2-mannosidase	1	-
125	exo- α -1,6-mannosidase	-	2
Total		9	30

Testes enzimáticos entre *P. citricarpa* e *P. capitalensis* realizados por Rodrigues (2010) e Romão (2011) corroboram os dados aqui obtidos. Esses estudos demonstraram que a espécie patogênica produz maior quantidade de enzimas envolvidas na degradação da parede celular do que a espécie endofítica. Dentre a síntese dessas enzimas, a produção de pectinases

foi evidenciada nesse estudo demonstrando que essas proteínas são produzidas em quantidade diferentes de acordo com o estilo de vida do fungo. Em *P. citricarpa* as pectinases estão envolvidas principalmente no desenvolvimento de sintomas. Já *P. capitalensis* emprega essas enzimas na colonização endofítica e de tecidos senescentes ou mortos (Romão *et al.*, 2011).

5.2.2.2 Fatores de transcrição

A família de fatores de transcrição mais expressa nas duas espécies foi a zn2cys6 que constitui a maior classe de fatores de transcrição em fungos (Figura13; tabela 12, anexo). Esses fatores são formados por seis resíduos de cisteína que se ligam a dois átomos de zinco (por isso a denominação zn2cys6) e estão envolvidos em diversos processos celulares como o metabolismo de açúcares e aminoácidos, remodelação da cromatina, gliconeogênese, respiração, ciclo celular, respostas a estresse, entre outros (MacPherson *et al.*, 2006; Shelest, 2008). Muitos desses fatores de transcrição estão relacionados com a patogenicidade em fungos fitopatogênicos regulando a síntese de metabólitos secundários, transportadores multidrogas do tipo ABC e MFS (Cuomo *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2011; Sanglard, 2011). O que pode explicar a identificação de grande quantidade de genes expressos em *P. citricarpa* envolvidos em metabolismo secundário e transportadores do tipo ABC e MFS. Seguindo esse raciocínio, tais fatores de transcrição podem estar intimamente ligados com a patogenicidade dessa espécie.

A família de fatores de transcrição C2H2 foi expressa somente em *P. capitalensis* (Figura 13; tabela 12, anexo). Tal família é um dos fatores de transcrição mais comuns de eucariotos. Em fungos esses fatores de transcrição tem função global e medeiam processos de síntese de metabólitos secundários, regulação de catabolismo do carbono, e processos de nodulação (Keller *et al.* 2005; Godiard *et al.*, 2007; Portnoy *et al.*, 2011; Malapi-Wight *et al.*, 2013). Estudos com *Trichoderma reesii* demonstraram que o fator de transcrição C2H2-ACE1 regula negativamente a expressão de xilanases e celulases (Malapi-Wight *et al.*, 2013), o que pode explicar a identificação de baixa quantidade enzimas degradadoras de parede celular vegetal na espécie endofítica.

Apesar desses fatores de transcrição não terem sido encontrados em *P. citricarpa*, foram identificados onze domínios C2H2 de função desconhecida nessa espécie (Tabela 12, anexo). Estudos demonstraram que esse tipo de fator de transcrição regula a síntese de micotoxinas como aflotoxina, estrigmatomicina e gliotoxinas. Genes envolvidos na síntese dessas toxinas foram identificadas em *P. citricarpa* (explicados no tópico metabolismo

secundário) o que leva a inferência de que os domínios C2H2 encontrados nessa espécie podem apresentar alguma relação com a expressão desses genes (Teichmann *et al*, 2010).

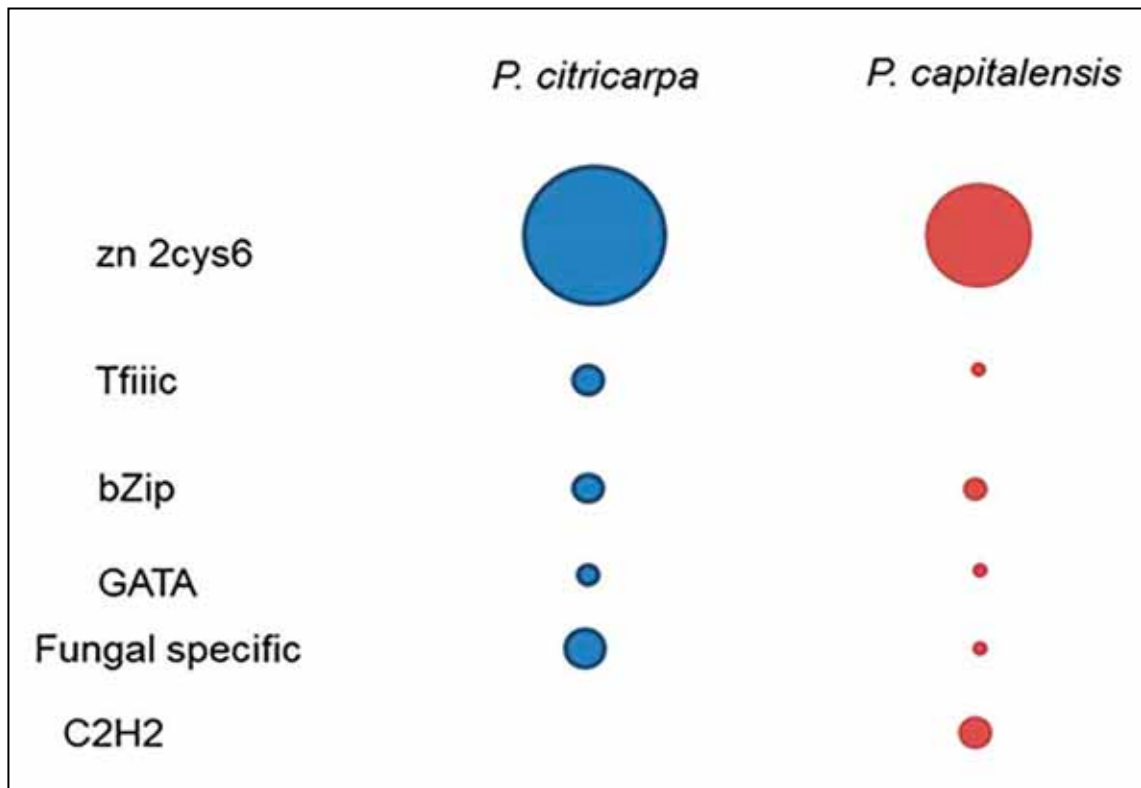


Figura 13. Principais grupos de fatores de transcrição expressos em *P. citricarpa* e *P. capitalensis*. O diâmetro da circunferência corresponde à quantidade de genes em cada categoria.

Em *P. citricarpa* foram identificados quatro genes codificantes para um tipo de fator de transcrição específico de fungos - *fungus specific transcription factor domain* (Tabela 12, anexo). Essas proteínas constituem a segunda maior classe de fatores de transcrição fúngica, no entanto, os domínios dessas proteínas e suas funções não foram totalmente esclarecidas. Acredita-se que os *fungus specific transcription factor domain* desempenhem papel no metabolismo de açúcares e de aminoácidos, gliconeogênese, catabolismo de ácidos graxos, entre outros (Shelest, 2008).

Os bZip consistem em uma família extremamente conservada de fatores de transcrição em eucariotos (Amoutzias *et al.*, 2007). Em fungos, essa família ativa genes de resposta a estresse induzidos por metais pesados, drogas, estresse oxidativo e osmótico em fungos (Guo *et al.*, 2011; Moye-Rowley, 2003; Nicholls, Straffon, & Enjalbert, 2004). Nesse estudo foram encontrados três genes que codificam fatores de transcrição bZip expressos na espécie

patogênica (GO:0003700, GO:0003700; GO:0003700) e dois genes na espécie endofítica (GO:0003677; GO:0003677) (Figura 13; tabela 12, anexo).

Observou-se a expressão de três genes que codificam fatores de transcrição GATA em *P. citricarpa* e dois genes codificantes desses fatores em *P. capitalensis* (Figura 13 tabela 12, anexo). Fatores de transcrição do tipo GATA compreendem um domínio *zinc finger* e quatro cisteínas (Scazzocchio, 2000; Shelest, 2008). GATA em fungos regula a síntese de sideróforos, reprodução, metabolismo de nitrogênio e está envolvido com o desenvolvimento de estruturas de infecção (Wilson *et al.*, 2010). Em *Aspergillus nidulans* esses fatores foram relatados estando envolvidos na regulação da expressão de celulases e na utilização de diferentes fontes de nitrogênio (Aro *et al.*, 2005).

Foi identificado nas duas espécies fatores de transcrição com o domínio de ligação CCAAT (GO:0006109; GO:0006109). A sequência CCAAT é encontrada na extremidade 5' de aproximadamente 30% dos genes de eucariotos. Um complexo multimerico de proteínas conservadas reconhece e se liga a essa região promovendo a regulação de diversos genes envolvidos na fosforilação oxidativa, no crescimento fúngico em locais com fontes de carbono não fermentáveis e na expressão de genes que codificam enzimas degradadoras de parede celular vegetal (Aro & Penttilä, 2004, Aro *et al.*, 2005). O primeiro complexo multimérico descrito, que se ligavam a sequencia CCAAT, foram as proteínas HAP (*Hap2*, *Hap3*, *Hap4* e *Hap5*) identificadas em *Saccharomyces cerevisiae*. Homólogos desse complexo de proteínas foram identificados em diversos fungos (como identificado nesse trabalho-tabela 12, anexo) demonstrando que esse complexo é conservado entre espécies e que podem apresentar funções semelhantes. Maiores estudos sobre os fatores de transcrição CCAAT podem elevar a uma maior compreensão das exigências nutricionais de *P. citricarpa* e *P. capitalensis* e conseqüentemente, maior compreensão da patogenicidade ou simbiose dessas espécies.

Na espécie patogênica foi identificado um fator de transcrição PacC (GO:0009987) (Tabela 12, anexo). Esse fator de transcrição regula a expressão de genes em resposta ao pH do ambiente. Estudos demonstram que esse fator de transcrição promove a expressão genes que codificam diversas famílias de enzimas degradadoras de parede celular vegetal (Aro *et al.*, 2005; Alkan *et al.*, 2013).). Análise transcriptômica do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* demonstrou que esse fator de transcrição é responsável pelo ajuste fino da expressão de diversos genes em resposta ao pH ambiental . O estudo provou que os fatores de transcrição PacC são fundamentais para a patogenicidade de *C. gloeosporioides* principalmente na colonização necrotrófica, ativando genes em resposta a ambientes alcalinos e reprimindo

genes cujas proteínas atuam em ambientes ácidos, e também para fungos que necessitam acidificar o meio para a sua colonização como *Magnaporthe oryzae*. (Alkan *et al*, 2013).

5.2.2.3 Metabólitos secundários

Metabólitos secundários são moléculas bioativas de baixo peso molecular produzidas em estágios específicos do ciclo de vida do organismo e que não são essenciais para a sobrevivência do mesmo. (Keller *et al.*, 2005; Yin & Keller, 2011).

No total, a categorização realizada pelo programa blast2go identificou 32 genes envolvidos com metabólitos secundários na espécie patogênica e apenas 12 na espécie endofítica (tabela 13, anexo). Foi observado que a maioria dos genes de *P. citricarpa* apresenta funções envolvidas com processos de oxido-redução ao passo que os genes que estão envolvidos com metabolismo secundário em *P. capitalensis* apresentam-se envolvidos com processos de desenvolvimento de estruturas de reprodução (tabela 13, anexo).

Na espécie endofítica, foi observado a expressão de um gene envolvido na biossíntese de melanina (GO:0042438). Os metabólitos secundários mais evidentes no reino fúngico são os responsáveis pela pigmentação. A coloração preta ou marrom está relacionada com a síntese de melanina que confere cor a diversas estruturas do fungo como esporos, apressórios e está intimamente ligada com a patogenicidade (Yu & Keller, 2005).

A classificação dos metabólitos secundários é realizada de acordo com a enzima envolvida em seu processo biossintético: policetídeos (sintetizados por policetídeo sintases – PK), policetídeos não ribossomais (produzido por não ribossomais policetídeo sintase -NRPS), terpenos (sintetizado por terpeno ciclase) e dimetilalil-triptofano (produzido por dimetilalil-triptofano sintase – DMAT) (Spanu *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2005). Dentre os genes categorizados, a espécie patogênica apresentou cinco enzimas envolvidas na síntese desses metabólitos: três genes que codificam PKs e dois genes para NRPSs. Já a espécie endofítica apresentou apenas dois genes para PKs (Tabela 13, anexo).

Muitos desses compostos secundários produzidos por microrganismos são toxinas que podem apresentar atividade antibacteriana (como, por exemplo, a penicilina), antifúngica, antiviral e anticancerígena. A síntese de toxinas é importante para a patogenicidade de diversos fungos, sobretudo fungos necrotróficos que empregam essas toxinas juntamente com enzimas degradadoras de parede celular para matar a célula hospedeira (Idnurm & Howlett, 2001; Tudzynski & Sharon, 2003; Horbach *et al*, 2011). Foram caracterizados seis genes envolvidos na síntese de toxinas em *P. citricarpa* (Tabela 13, anexo). Entre essas vias

identificou-se um gene da via da biossíntese de Estrigmatocistina (GO:0045461), gliotoxina e penicilina (GO:0042318). Esses dois últimos foram primeiramente descritos em fungos patogênicos humanos apresentando, entre outras funções, atividade antimicrobiana (Stergiopoulos *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2012).

Dezenove genes que codificam citocromo P450 foram identificados em *P. citricarpa*, contra três genes mapeados em *P. capitalensis* (Tabela 13, anexo). Esses citocromos desempenham papéis importantes no metabolismo primário e secundário, atuando no processo de produção de toxinas e degradação de compostos antifúngicos produzidos pela planta hospedeira (Gan *et al.*, 2013). A maioria dos genes que codificam para citocromo P450 está envolvida em atividades de monooxigenase e oxidoreductase. Essas enzimas foram caracterizadas na biossíntese de micotoxinas e a interrupção desses genes levaram a redução da virulência em *Botrytis cinerea* e *Nectria haematococca* (Siewers *et al.*, 2005; Coleman *et al.*, 2010). Com base nesses estudos pode-se inferir que os genes identificados estejam também envolvidos na biossíntese de toxinas e na desintoxicação em *P. citricarpa*.

5.2.2.4 Proteases e proteínas secretadas

Proteases (também conhecidas como peptidases, proteinases ou enzimas proteolíticas) são proteínas que catalisam a clivagem de ligações pépticas em outras proteínas (Merops, 2013). Essas enzimas são importantes em diversos processos fisiológicos fúngicos como digestão de proteínas, maturação hormonal, resposta imune, germinação de esporos, etc (Amselem *et al.*, 2011; Mercado-Flores, Hernández-Rodríguez, Ruiz-Herrera, & Villa-Tanaca, 1998; Rao & Tanksale, 1998).

Foi observado grande número de genes que codificam proteases, principalmente na espécie patogênica (Figura 14), sendo que, a maioria desses genes codificam endopeptidases (Tabela 14, anexo).

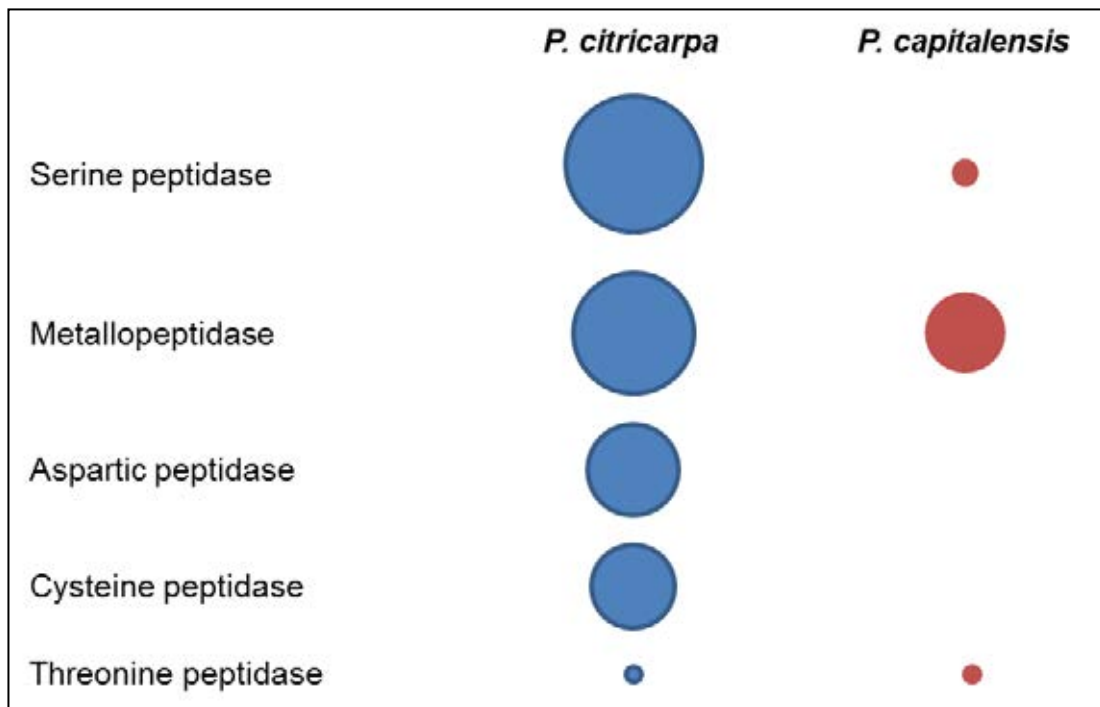


Figura 14. Genes que codificam peptidases expressos em *P. citricarpa* e *P. capitalensis*. A circunferência do círculo corresponde à quantidade de genes expressos em cada categoria.

Superóxido dismutase (SOD) são um grupo de metaloproteases que atuam na proteção do organismo contra danos causados por ROS. Essas enzimas degradam o radical superóxido (O_2^-) em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio produzido é então degradado por catalases e peroxidases. SODs são encontradas em diversos microrganismos aeróbios e anaeróbios e há indícios de que essas enzimas atuem na patogenicidade de diversos fungos (Tudzynski & Sharon, 2003; Veluchamy *et al.*, 2011). Em organismos simbiotes foi demonstrado que SOD apresenta papel importante no processo de formação do complexo micorrizico e na nodulação induzindo pequenas explosões oxidativas que promovem o colapso de ramos arbusculares (Lanfranco *et al.*, 2005). Em fungos endofíticos foi demonstrado que a proteção conferida por SOD contra ROS é importante para interação simbiótica (Zhang *et al.*, 2011). No fungo endofítico *Epichloe festucae*, SOD apresenta papel importante na relação planta-microrganismo, no qual o crescimento e ramificação das hifas é controlado por explosões oxidativas controladas em resposta a sinalização hospedeira (Takemoto *et al.*, 2007; Heller & Tudzynski, 2011). Foi identificada em *P. capitalensis* a expressão de dois genes que codificam SOD (GO:0016532, GO:0006801) (Tabela 14, anexo), indicando que, assim como nos trabalhos a cima, essas enzimas podem atuar na interação entre o fungo endofítico e a planta hospedeira.

Estudos recentes têm demonstrado a importância de proteínas secretadas para a patogenicidade de diversos fungos. Muitas dessas proteínas são efetores: proteínas de pequeno tamanho (≤ 300 aminoácidos) e de baixa similaridade com outras proteínas e que ao serem secretadas promovem alterações fisiológicas em outros organismos (Petre & Kamoun, 2014).

As proteínas secretadas podem ser classificadas em dois grupos: as que são secretadas por vias clássicas, que apresentam em sua região N-terminal um peptídeo sinal; e as proteínas que são secretadas por vias não-clássicas, as quais não apresentam peptídeo sinal e são exportadas por um mecanismo denominado sistema de secreção líder (Cheng-yun & Jing, 2011).

Para a identificação de proteínas com peptídeo sinal, foi utilizada a ferramenta Signal P que caracterizou 31 genes em *P. capitalensis* e 41 genes em *P. citricarpa* (Tabela 15, anexo). Apesar da presença do peptídeo sinal em proteínas ser um forte indício da síntese de efetores pelas espécies estudadas, maiores análises precisam ser feitas para a determinação dessas proteínas.

5.2.2 Enriquecimento de vias

A análise de enriquecimento de vias executado na ferramenta Kegg permitiu uma melhor compreensão de diversas vias metabólicas das espécies estudadas (*P. citricarpa* e *P. capitalensis*). Os dados gerados confirmaram a presença de um número maior de genes envolvidos com vias de transdução de sinal na espécie endofítica em relação à espécie patogênica (Tabela 16, anexo). Na via das MAP-quinases foi possível observar genes de *P. citricarpa* que não haviam sido identificados pelo programa Blast2go.

Fungos filamentosos apresentam três vias de MAP-quinases que respondem a estímulos distintos: a via das MAP-quinases ativadas por estresse, que é ativada em resposta a estresses ambiental; A via de resposta a feromônio/filamentação, que induzem a parada do ciclo celular e a formação de células necessárias para a reprodução em resposta a feromônios e a via de integridade da parede celular responsável pela remodelação e biogênese da parede celular em resposta a estresse celular ou em certos pontos do ciclo celular (Perotto & Baluska, 2012). Pode-se observar, principalmente em *P. capitalensis* que os genes identificados, estão homogeneamente distribuídos entre as três vias citadas (Figura 15).

Além das vias das MAP-quinases, foi possível identificar genes envolvidos com via de sinalização de cálcio em *P. capitalensis* (Figura 16, Tabela 15, anexo). Trabalhos demonstram

a importância dessas vias na comunicação entre a planta e microorganismos simbiotes, favorecendo o estabelecimento de uma interação benéfica (Vadassery & Oelmüller, 2009, Bonfante & Requena, 2011, Dodd *et al*, 2010).

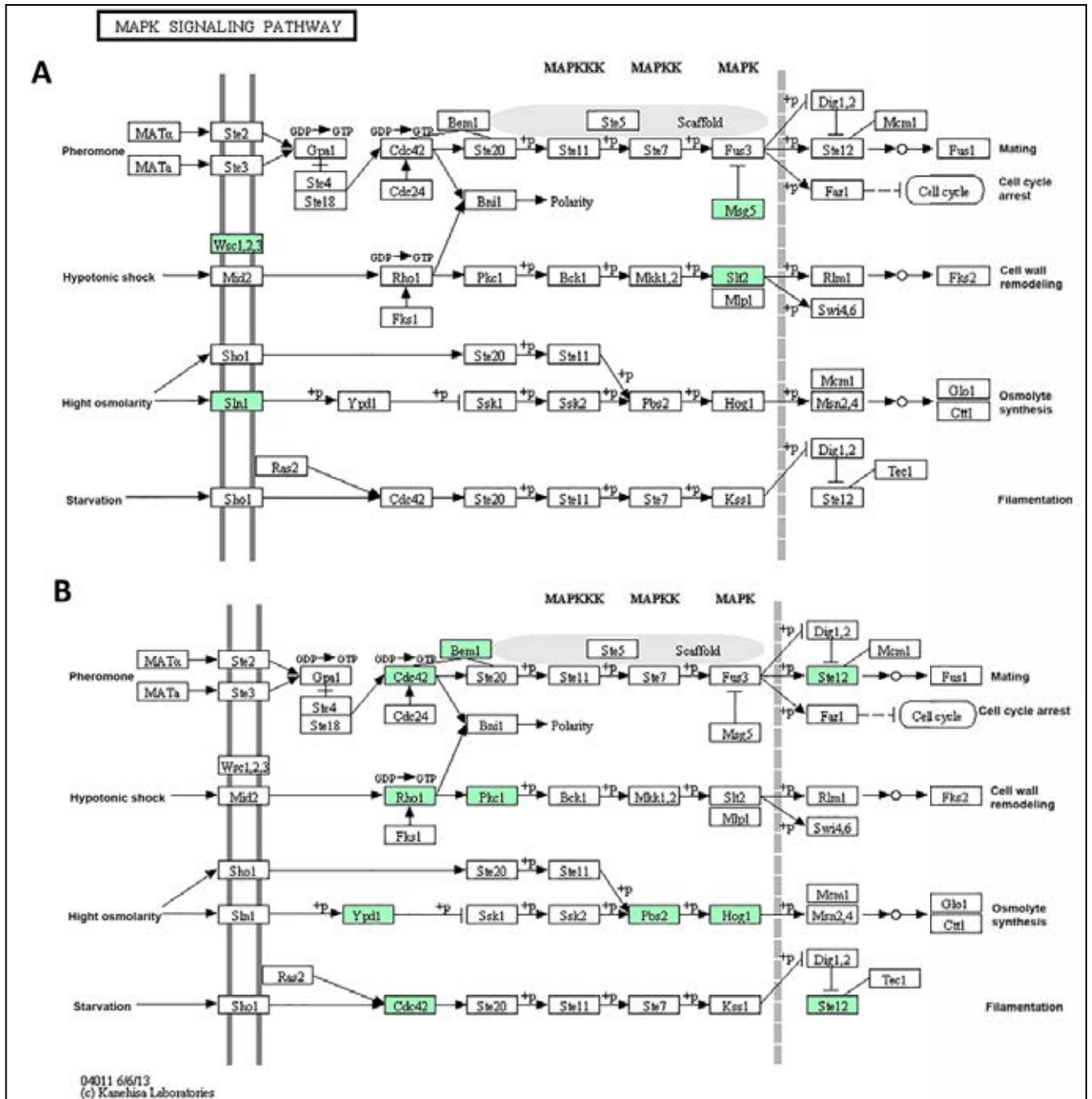


Figura 15. Vias de transdução de sinais das MAP-quinases de *P. citricarpa* (A) e *P. capitalensis* (B). Os genes sinalizados em verde correspondem aos genes expressos nas espécies.

patógeno-hospedeiro expressos na espécie endofítica em comparação com a espécie patogênica (Figura 18). O leva a inferência de que *P. capitalensis* emprega esses genes na interação benéfica com a planta hospedeira.

Vadassery & Oelmüller (2009) propuseram que microrganismos mutualistas e patogênicos compartilham componentes de sinalização. Muito provavelmente, outras vias importantes para a patogenicidade ou simbiose são compartilhadas entre eles. Nesse sentido, pode-se supor que a interação benéfica, ou não, entre hospedeiro e microrganismo, resulta da forma como o microrganismo emprega sua maquinaria gênica e como o hospedeiro responde à esses organismos. Estudos verificaram que bactérias compartilham mecanismos semelhantes de patogenicidade de simbiose para facilitar a colonização de um determinado ambiente (Hentschel *et al.*, 2000). Foi evidenciado que fungos biotróficos e micorrizas simbiotes compartilham mecanismos de infecção, como a adesão de esporos e a formação de apressório durante a penetração (Paszkowski, 2006).

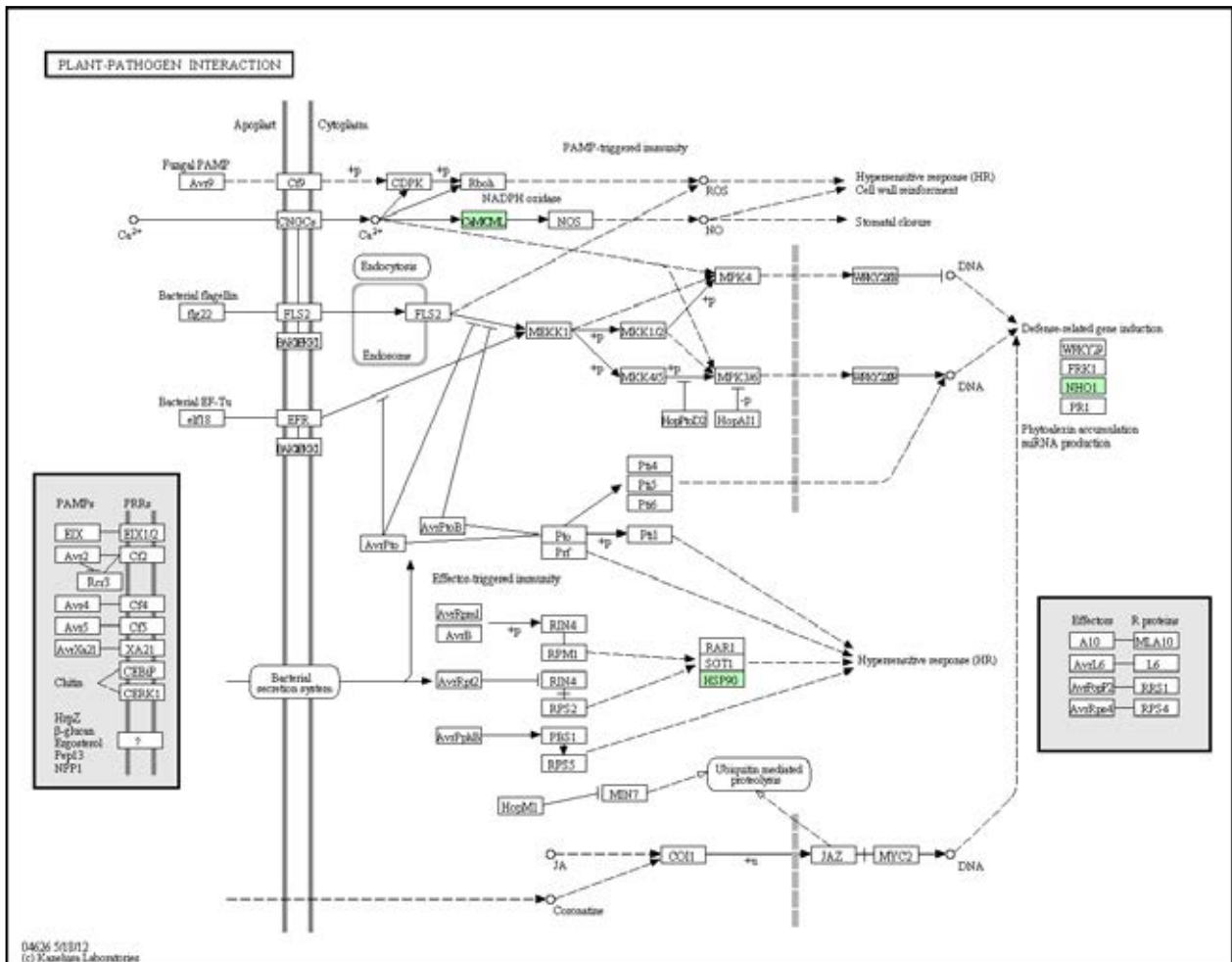


Figura 17. Via de interação planta-patógeno de *P. capitalensis*. Genes sinalizados em verde representam os genes expressos na espécie.

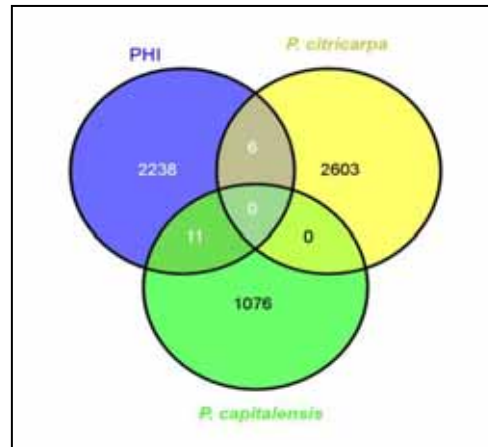


Figura 18. Diagrama de venn representando o alinhamento entre os transcritos de *P. citricarpa* e *P. capitalensis* e o banco de dados PHI database

5.3 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

5.3.1 Genes endógenos

A especificidade dos genes endógenos candidatos foi confirmada através de da curva de dissociação obtida ao final da RT-qPCR que apresentou apenas um único pico, demonstrado a presença de apenas um *amplicon* (Figura 19) e por meio do sequenciamento de Sanger que confirmou a amplificação dos genes de interesse.

Com exceção de GPD e 18S2 todos os demais *primers* apresentaram níveis de eficiência satisfatórios (Tabela 9).

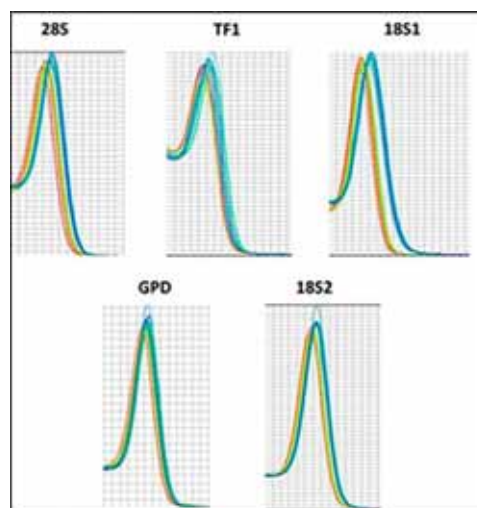


Figura 19. Avaliação dos primers através da curva de dissociação gerada ao final da RT-qPCR. Amplificação de cDNA de *P. citricarpa* e *P. capitalensis* para os genes 28S, TF1, 18S e GPD

Tabela 9. Eficiência (%) dos primers gerados pelo programa Miner para os genes endógenos candidatos.

Gene	Eficiência(%)
28S	0,95
TF1	0,99
18S1	0,93
GPD	0,88
18S2	0,7

Os dados de eficiência e Cq gerados no software Miner foram utilizados no programa Genorm para identificar os melhores normalizadores através da determinação do *M-value*. Os resultados gerados apontaram que todos os genes apresentavam valores de *M-value* inferiores ao valor de corte (0,15), ou seja, todos foram considerados bons normalizadores. Os candidatos mais estáveis foram o 28S e 18S1, portanto foram selecionados como normalizadores para esse trabalho (Figura 20).

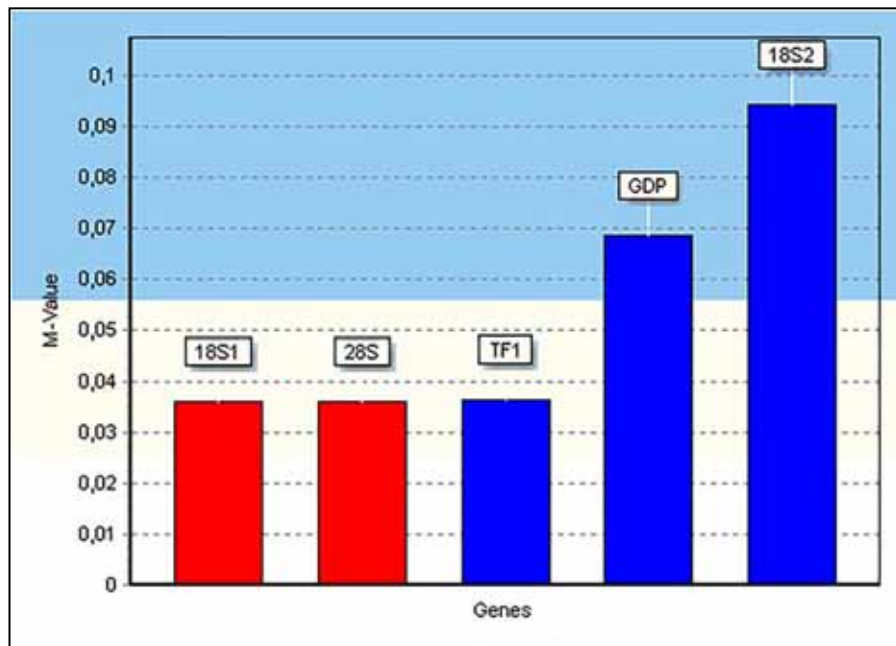


Figura 20. M-value dos genes candidatos a normalizadores. Barras de cor vermelha apontam os genes que apresentam os menores M-values.

5.3.2 Validação do RNA-seq

Quatro genes foram escolhidos para a validação dos perfis de expressão obtidos no RNA-seq através de RT-qPCR (Tabela 10).

Tabela 10. Genes selecionados a partir da análise de RNA-seq para validação por RT-qPCR.

Nome da sequencia	Produto do gene	log ₂ (fold_change)	G.O	Espécie
contig10248.g11805	c2h2 transcription factor	2,30804	GO:0000909	<i>P. capitalensis</i>
contig211.g286	glycerol kinase	3,41504	GO:0005975	<i>P. capitalensis</i>
contig6323.g8028	auxin efflux carrier superfamily	4,20895	GO:0055085	<i>P. citricarpa</i>
contig15498.g15179	gliotoxin biosynthesis protein	3,79075	-	<i>P. citricarpa</i>

A especificidade dos primers para esses genes foi confirmada por meio de sequenciamento e curva de dissociação, como descrito para os genes endógenos (Figuras 21 e 22).

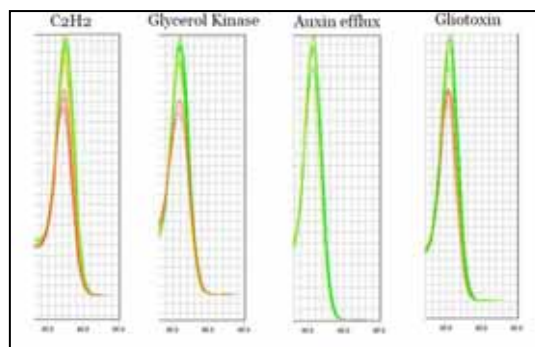


Figura 21. Validação dos *primers* através da curva de dissociação obtido após RT-qPCR. Amplificação de cDNA de *P. capitalensis* para os genes: C2H2, Glycerol Kinase, Auxin efflux e Gliotoxin

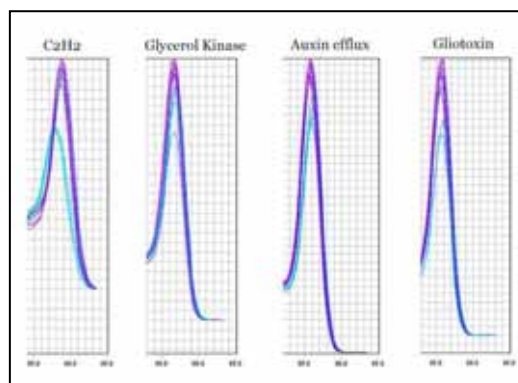


Figura 22. Validação dos *primers* através da curva de dissociação obtido após RT-qPCR. Amplificação de cDNA de *P. citricarpa* para os genes: C2H2, Glycerol Kinase, Auxin efflux e Gliotoxin

Os valores de expressão obtidos no RT-qPCR para esses genes foi similar aos valores encontrados no sequenciamento transcriptômico (Figura 23). Complementarmente foi realizado a análise de correlação de Spearman's Rho, técnica de correlação não paramétrica entre duas variáveis, visando identificar similaridade entre os resultados obtidos no RNA-seq e no RT-qPCR. O valor de correlação entre os resultados foi de (0,88) validando as análises de transcriptoma.

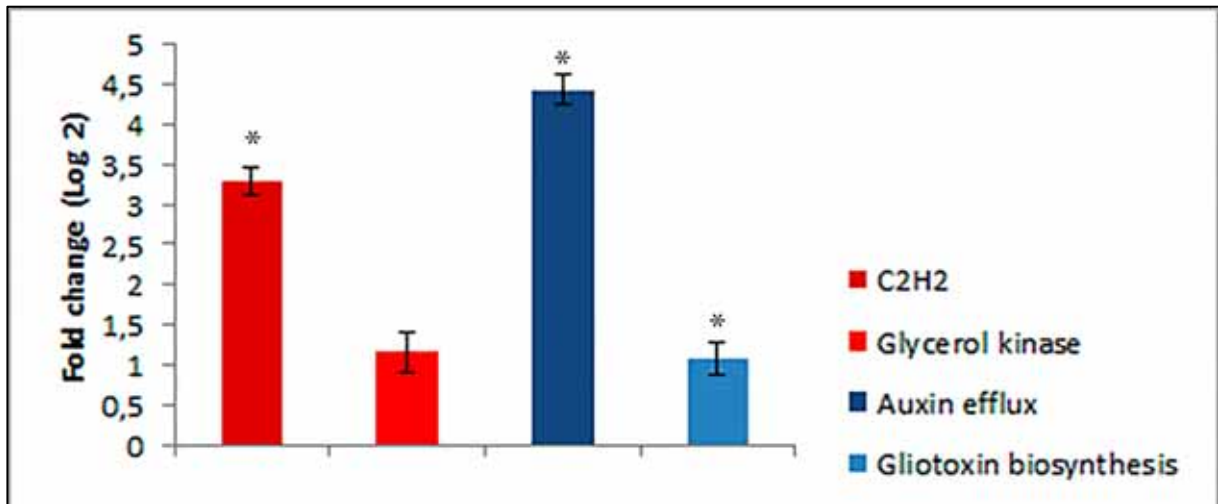


Figura 23. Expressão dos genes selecionados para validação do transcriptoma. Genes em vermelho representam os genes expressos em *P. capitalensis*. Genes em azul representam os genes expressos em *P. citricarpa*. (*) indica diferença significativa ($P > 0,05$)

5.3.3 Genes de patogenicidade de fungos

Buscando uma maior compreensão da biologia de *P. citricarpa* e *P. capitalensis* e da interação desses fungos com o a planta hospedeira, procurou-se identificar genes diferencialmente expressos envolvidos com os estágios iniciais de infecção, bem como alguns genes envolvidos na produção de toxinas entre essas duas espécies.

Quinze dos dezesseis genes selecionados foram identificados na espécie patogênica (Tabela 2). O *primer* para o gene THR1 demonstrou múltiplos picos na curva de dissociação da RT-qPCR, comprovando sua inespecificidade. Além disso, a sequência obtida após o sequenciamento para esse gene não apresentou similaridade com as sequências dos genes de interesse de outras espécies (dados não mostrados).

Apenas três genes foram identificados em *P. capitalensis*, isso possivelmente aconteceu porque os *primers* foram alinhados e desenhados apenas sob o genoma da espécie patogênica, ou seja, tais primers provavelmente foram desenhados em regiões genicas que não eram conservadas entre *P. citricarpa* e *P. capitalensis* (dados não mostrados).

Os genes identificados nas duas espécies foram: PKS1 (Poliketídio sintase 1), enzima envolvida na biossíntese de melanina; ToxC que codifica a sub unidade beta de uma síntese de ácidos graxos e ToxF que codifica uma transaminase de cadeia ramificada. ToxC e ToxF fazem parte de um cluster gênico envolvido na síntese da toxina HC em *Cochliobolus carbonum* (Wight *et al.*, 2013) (Figuras 24 e 25). A toxina HC pertence a um grupo de micotoxinas consideradas efetores de fungos necrotróficos, pois atuam apenas sobre um hospedeiro específico (*Host-specific toxin-HST*) e interagem com um alvo específico dentro da planta, assim como nas interações gene-a-gene de outros efetores (Friesen *et al.* 2008; Stergiopoulos *et al.*, 2012). A toxina HC é essencial à patogenicidade de *C. carbonum* e a deleção de genes dessa via Biosintética, entre eles ToxC e ToxF, promovem a redução da virulência na espécie (Ahn & Walton, 1997; Cheng *et al.*, 1999). Além das espécies do gênero *Cochliobolus*, ortólogos aos genes envolvidos na síntese da toxina HC foram relatados em *Fusarium semitectum* (Jin *et al.*, 2010) e em *Alternaria jesenskae* (Wight *et al.*, 2013), assim como relatado para *C. carbonum*, os genes caracterizados nessas espécies estão envolvidos com a biossíntese de toxinas e patogenicidade.

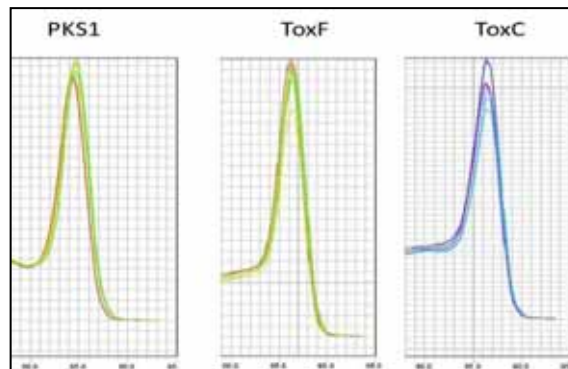


Figura 24. Avaliação dos primers através da curva de dissociação obtida após RT-qPCR. Amplificação de cDNA de *P. capitalensis* para os genes PKS1, ToxF e ToxC.

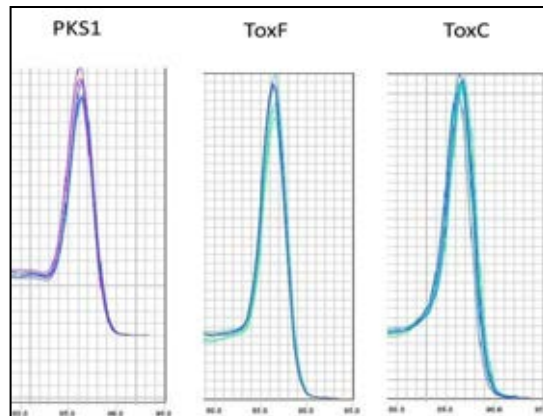


Figura 25. Avaliação dos primers através da curva de dissociação obtida após RT-qPCR. Amplificação de cDNA de *P. citricarpa* para os genes PKS1, ToxF e ToxC.

A análise da expressão desses genes realizada através de RT-qPCR, demonstrou super-expressão dos genes ToxF e ToxC em *P. citricarpa* (Figura 26). Tais resultados levam a inferência de que esses genes provavelmente estão envolvidos na biossíntese de alguma toxina que pode ser essencial a patogenicidade desse fungo, no entanto, mais estudos são necessários para a caracterização funcional desses genes.

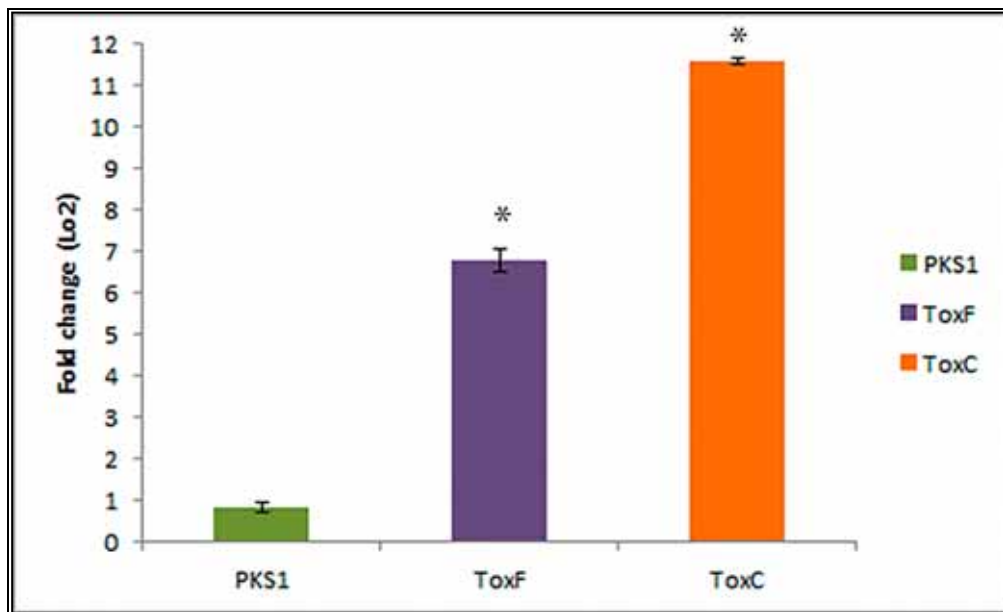


Figura 26. Expressão dos genes candidatos em *P. citricarpa*. (*) indica diferença significativa ($P > 0,05$).

7. Considerações finais

Fungos fitopatogênicos constituem um entrave na produção de alimentos mundial, promovendo a redução da produção e aumento dos custos com manejo de diversas culturas.

Em contra partida, a quantidade de fungos em interação simbiótica com plantas é muito maior do que à de fungos patogênicos. Muitos desses microrganismos simbiontes promovem o aumento do *fitness* do hospedeiro, fortalecendo o sistema imune e os mecanismos de defesa contra patógenos.

Considerando que fungos simbióticos e fitopatogênicos podem apresentar maquinaria genética semelhante, estudos de genômica e transcriptômica constituem um excelente mecanismo para desvendar as diferenças cruciais para a terminação do estilo de vida do fungo, promovendo maior compreensão da biologia e dos mecanismos de interação dessas espécies com a planta hospedeira.

P. citricarpa e *P. capitalensis* são espécies muito próximas, e possuem um hospedeiro em comum, no entanto, apresentam estilos de vida completamente diferentes. Nesse sentido os resultados obtidos nesse trabalho contribuem para melhor compreensão da maquinaria genética dessas espécies.

O genoma das duas espécies são bastante semelhantes, apresentando quantidades similares de genes na maioria das categorias analisadas. As diferenças encontradas limitaram-se ao metabolismo do carbono e de aminoácidos, transportadores ABC e fosfatases alcalinas, nos quais, a espécie endofítica apresentou menores quantidades de genes.

Contudo, diferenças significativas entre *P. citricarpa* e *P. capitalensis* foram observadas em nível transcricional. Apesar dos dados do genoma apontar quantidades similares de genes envolvidos com vias de sinalização entre as espécies, foi observado no transcriptoma que a espécie endofítica apresentou maior quantidade de genes envolvidos nessas vias do que a espécie patogênica, o que sugere que as vias de sinalização, de um modo geral, são importantes na comunicação entre a espécie endofítica e a planta hospedeira.

Diferenças a nível transcricional foi também observado em relação a enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal. As duas espécies apresentam em seu genoma quantidades semelhantes de genes que codificam essas enzimas. No entanto, *P. citricarpa* apresentou quantidades maiores de genes expressos do que *P. capitalensis*, demonstrando que essas enzimas podem ser importantes para a patogenicidade desse fungo.

Além das enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal, diversas vias conhecidas por atuar na patogenicidade de diversos fungos foram diferencialmente expressas

entre as espécies. Foi observado maior quantidade de genes envolvidos no metabolismo secundário, bem como síntese e transporte de toxinas, em *P. citricarpa* do que em *P. capitalensis*, demonstrando que espécie patogênica interage de forma mais agressiva com o hospedeiro do que a espécie endofítica, utilizando toxinas para penetrar e colonizar a planta. Para se proteger do contra- ataque do hospedeiro, a espécie patogênica ativa mecanismos de desintoxicação por meio da expressão de genes que codificam citocromos p450, e transportadores de toxinas.

Regulando a expressão desses genes, foi observada a expressão de diversas famílias de fatores de transcrição, principalmente em *P. citricarpa*. Tais modulam a expressão de genes envolvidos e diversas vias do metabolismo primário e secundário, síntese de enzimas envolvidas na degradação de parede celular, transportadores de toxinas, mecanismos de resposta a diversos tipos de estresse, e adaptação do fungo a diversos ambientes e condições nutricionais.

A análise de enriquecimento de vias e o alinhamento local contra o banco de dados de interação patógeno-hospedeiro (PHI-base) apontaram maior expressão de genes envolvidos com patogenicidade e interação planta-patógeno em *P. capitalensis* do que em *P. citricarpa*, sugerindo que diferentemente dos patógenos, a espécie endofítica emprega essa maquinaria na instalação e manutenção de uma interação benéfica com a planta hospedeira.

A partir dos dados apresentados, pode-se concluir que os dados genômico e transcriptômico obtidos nesse trabalho contribuem para a compreensão da biologia de *P. citricarpa* e *P. capitalensis*, propiciando uma visão geral dos mecanismos que permeiam a interação dessas espécies com a planta hospedeira.

Adicionalmente, espera-se que este trabalho contribua com estudos futuros da genética dessas espécies que culminem e tecnologias de controle e manejo da Mancha Preta dos Citros.

7. Referência Bibliográfica

- AGUIAR-VELOSO, C. I.; RIBEIRO, J. G. B.; FEICHTEBERGER, E.; GOES, A.; SPOSITO, M. B.; **Manual técnico da Mancha Preta dos Citros**. Ministério da Agricultura, Brasília, 2002.
- AGOSTINI, J., & Peres, N.. Effect of fungicides and storage conditions on postharvest development of citrus black spot and survival of *Guignardia citricarpa* in fruit tissues. **Plant Disease**, p.1419–1424, 2006
- AHN, J. H. & Jonathan D. WALTON, J. D.A Fatty Acid Synthase Gene in *Cochliobolus carbonum* Required for Production of HC-Toxin, Cyclo(D-Prolyl-L-Alanyl-D-Alanyl-L-2-Amino-9,10-Epoxi-8-Oxodecanoyl). **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 10, n. 2, p. 207–214, 1999.
- ALMEIDA, T. F.; **Mancha Preta dos Citros: expressão dos sintomas em frutos pela inoculação com conídios e controle do agente causal (*Phyllosticta citricarpa*)**. Tese (doutorado). UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” Unesp, Jaboticabal 2009.
- ALKAN, N.; MENG, X.; FRIEDLANDER, G.; REUVENI, E.; SUKNO, S.; SHERMAN, A.; THON, M.; FLUHR, R.; PRUSKY, D. Global Aspects of *pacC* Regulation of Pathogenicity Genes in *Colletotrichum gloeosporioides* as Revealed by Transcriptome Analysis. **Molecular plant-pathogen interactions**, v. 26, n. 11, p. 1345–1358, 2013.
- ALY, A. H., DEBBAB, A., & PROKSCH, P.. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied microbiology and biotechnology**, v.90, n.6, p.1829–45, 2011.
- AMOUTZIAS, G. D., VERON, a S., WEINER, J., ROBINSON-RECHAVI, M., BORNBERG-BAUER, E., OLIVER, S. G., & ROBERTSON, D. L.. One billion years of bZIP transcription factor evolution: conservation and change in dimerization and DNA-binding site specificity. **Molecular biology and evolution**, v.24, n.3, p.827–35, 2007.
- AMSELEM, J., CUOMO, C. a, VAN KAN, J. a L., VIAUD, M., BENITO, E. P., COULOUX, A., FILLINGER, S.. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. **PLoS one genetics**, v.7, n.8, 2011
- ANSORGE, W. J.. Next-generation DNA sequencing techniques. **New biotechnology**, v.25, n.4, 2009
- Apresentação panorama da citricultura no Mundo(2011)**. Associação Nacional dos exportadores de suco de citros. Disponível em: http://www.citrusbr.com.br/download/Apresentacao_CitrusBR_Parana17022011.pdf, Acesso em: 25 de Junho de 2012.

Aro, N., Pakula, T., & Penttilä, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS microbiology reviews**, v.29n.4, p 719–39, 2005

ARTICO, S., NARDELI, S. M., BRILHANTE, O., GROSSI-DE-SA, M. F., & ALVES-FERREIRA, M. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. **BMC plant biology**, v.10, n49,2010.

BAAYEN, R. P., BONANTS, P. J. M., VERKLEY, G., CARROLL, G. C., VAN DER AA, H. a, DE WEERDT, M., ... AZEVEDO, J. L. (a). Nonpathogenic Isolates of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, v.92, n.5, p464–477, 2002.

BALDASSARI, R. B., WICKERT, E., & GOES, A. (). Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from Citrus spp. **European Journal of Plant Pathology**, v.120, n.2, p.103–110, 2007

BENITO, B.; GARCIADABLÁS, B.; FRAILE-ESCANCIANO, A.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. Potassium and sodium uptake systems in fungi. The transporter diversity of *Magnaporthe oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 812–822, 2011

BITTEL, P., & ROBATZEK, S. Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. **Current opinion in plant biology**, v.10, n.4, 2007

BOLWELL, G. P., & DAUDI, A.. Reactive Oxygen Species in Plant-Pathogen interactionns. In DEL RIO, L. A.; PUPPO (orgs), **Reactive Oxygen Species in Plant Sinaling**. p 113–133, Springer 2009.

BONANTS, P., & CARROLL, G. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*. **European Journal of Plant Pathology**, p.503–513, 2003.

BORMANN, J. & TUDZYNSKI, P. Deletion of *Mid1*, a putative stretch-activated calcium channel in *Claviceps purpurea*, affects vegetative growth, cell wall synthesis and virulence. **Microbiology**. v.155, p. 3922–3933, 2009.

CAIXETA, M. P., CORAZZA, M. J., OLIVEIRA, R. R. De, ZANUTTO, C. A., NUNES, W. M. D. C., & VIDA, J. B. Caracterização morfofisiológica e identificação molecular de isolados de de *Guignardia citricarpa* agente patogênico da Mancha Preta dos Citros. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.30, n5, p.625–630, 2008.

CAMPOS, M.A.; RESENDE, M.L.V.; SILVA, M.S. Interações moleculares planta-patógeno. In: Faleiro, F.G.; Andrade, S.R.M. de; Reis Jr., F. B. (Ed.). **Org.). (Org.). Biotecnologia aplicada à agropecuária**, p.355-377. 1 ed. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados,2010, v. , p.355-377.

CANALE, M., BENATO, E., & CIA, P. In vitro effect of UV-C irradiation on *Guignardia citricarpa* and on postharvest control of citrus black spot. **Tropical Plant Pathology**, p.356–361, 2011.

CHENG, Y. Q.; AHN, J. H.; & WALTON, J. D. A putative branched-chain-amino-acid transaminase gene required for HC-toxin biosynthesis and pathogenicity in *Cochliobolus carbonum*. **Microbiology**, v. 145, p. 3539–3546, 1999

CHENG-YUN, L. & JING, Y. Mining Effector Proteins in Phytopathogenic Fungi, In: YANG, N. S. *Systems and Computational Biology: Molecular and Cellular Experimental Systems*. **InTech**, (2011). Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/systems-and-computational-biology-molecular-and-cellular-experimental-systems/mining-effector-proteins-in-phytopathogenic-fung>. Acesso em: fevereiro, 2014

Citrus Disease. Disponível em: <http://www.idtools.org/id/citrus/diseases/factsheet.php?name=Citrus%20black%20spot>, Acesso em: novembro, 2013

CHOQUER, M., LEE, M.-H., BAU, H.-J., & CHUNG, K.-R. Deletion of a MFS transporter-like gene in *Cercospora nicotianae* reduces cercosporin toxin accumulation and fungal virulence. **FEBS letters**, v.581, n.3, p.489–94, 2007.

CONESA, A., GÖTZ, S., GARCÍA-GÓMEZ, J. M., TEROL, J., TALÓN, M., & ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v.2,n.18, p.3674–6, 2005.

CORNELL, M. J., ALAM, I., SOANES, D. M., WONG, H. M., HEDELER, C., PATON, N. W., OLIVER, S. G. Comparative genome analysis across a kingdom of eukaryotic organisms: specialization and diversification in the fungi. **Genome research**, v.17n.12, p.1809–22, 2007.

CUOMO, C. A.; GÜLDENER, U.; XU, J.R.; TRAIL, F.; TURGEON, B. G.; DI PIETRO, A.; WALTON, J. D.; JUN MA, L.; BAKER, S. E.; REP, M.; ADAM, G.; ANTONIW, J.; BALDWIN, T.; CALVO, S.; CHANG, Y.L.; DECAPRIO, D.; GALE, L. R.; GNERRE, R.; GOSWAMI, R. S.; HAMMOND-KOSACK, K.; HARRIS, L. J.; HILBURN, K.; KENNEL, J. C.; KROKEN, S.; MAGNUSON, J. K.; MANNHAUPT, G.; MAUCELI, E.; MEWES, H. W.; MITTERBAUER, D.; MUEHLBAUER, G.; MÜNSTERKÖTTER, M.; NELSON, D.; O'DONNELL, K.; OUELLET, T.; QI, W.; QUESNEVILLE, H.; RONCERO, M. I. G; SEONG, K. Y.; TETKO, I. V.; URBAN, M.; WAALWIJK C.; WARD, T. J.; YAO, J.; . BIRREN, B. W.; KISTLER, H. C.; The *Fusarium graminearum* Genome Reveals a Link Between Localized Polymorphism and Pathogen Specialization **Science**, v.317 n. 5843 p. 1400-1402, 2007

DE JONGE, R., BOLTON, M. D., & THOMMA, B. P. H. J.. How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. **Current opinion in plant biology**, v.14, n.4, p.400–6, 2011.

- DEL SORBO, G., SCHOONBEEK, H., & DE WAARD, M. a. Fungal Transporters Involved in Efflux of Natural Toxic Compounds and Fungicides. **Fungal Genetics and Biology**, v.30, n.1, p.1–15, 2000.
- DIGUISTINI, S., LIAO, N. Y., PLATT, D., ROBERTSON, G., SEIDEL, M., CHAN, S. K., ... JONES, S. J. De novo genome sequence assembly of a filamentous fungus using Sanger, 454 and Illumina sequence data. **Genome biology**, v10,n.9, 2009.
- DUNN, M. F., RAMÍREZ-TRUJILLO, J. a, & HERNÁNDEZ-LUCAS, I.. Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis. **Microbiology (Reading, England)**, v.155, p.3166–3175, 2009.
- DYAKOV, Y., DZHAVAKHIYA, V., & KORPELA, T. **Comprehensive and molecular phytopathology**, Elsevier, 1 ed. 2007
- EATON, C. J., COX, M. P., AMBROSE, B., BECKER, M., HESSE, U., SCHARDL, C. L., & SCOTT, B.. Disruption of signaling in a fungal-grass symbiosis leads to pathogenesis. **Plant physiology**, v.153, n.4, p.1780–94, 2010.
- EVERETT, K., & REES-GEORGE, J. (2006). Reclassification of an isolate of *Guignardia citricarpa* from New Zealand as *Guignardia mangiferae* by sequence analysis. **Plant pathology**, p.194–199, 2006.
- EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M. C., & GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred.? I. Accuracy?Assessment. **Genome Research**, v.8, n.3, p.175–185, 1998.
- FEICHTENBERGER, E. **Mancha preta ou pinta preta dos citros**. Laranja & Cia. v. 43, p. 10-11, 1996.
- FIGUEIREDO, J. G., GOULIN, E. H., TANAKA, F., STRINGARI, D., KAVA-CORDEIRO, V., GALLI-TERASAWA, L. V, GLIENKE, C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*. **Journal of microbiological methods**, v.80, n.2, p.143–7, 2010.
- FIGUEIREDO, J. G.; **Agrotransformação de *Guignardia citricarpa* e *xylaria* sp. E contabilidade vegetativa em *Guignardia citricarpa* e *Phyllosticta* spp.** Tese (doutorado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011
- FU, Z. Q., & DONG, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. **Annual review of plant biology**, v.64, p.839–863, 2013.
- GAN, P., IKEDA, K., IRIEDA, H., NARUSAKA, M., O'CONNELL, R. J., NARUSAKA, Y., SHIRASU, K.. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. **The New phytologist**, v.197, n.4, p.1236–1249, 2013.
- GLIENKE, C., Pereira, O. L., Stringari, D., Fabris, J., Kava-Cordeiro, V., GALLI-TERASAWA, L., CROUS, P. W. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. **Persoonia**, v.26, p47–56, 2011.

GLIENKE-BLANCO, C. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. **Genetic and Molecular Biology**, v.255, p.251–255, 2002.

GLIENKE, C. **Guignardia citricarpa Kiely: Análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro**. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1999.

GOES, A. FEICHTENBERGER, E. **Etiologia, aspectos epidemiológicos e controle de *Guignardia citricarpa* agente causal da Mancha Preta dos Citros**. Relatório Técnico, 2005

GÖHRE, V., & ROBATZEK, S. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant **immunity**. **Annual review of phytopathology**, v.46, p.189–215, 2008.

GRONOVER, C. S., KASULKE, D., TUDZYNSKI, P., & TUDZYNSKI, B. The role of G protein alpha subunits in the infection process of the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v.14, n.11, p.1293–1302, 2001.

GODIARD, L.; NIEBEL, A.; MICHELI, F.; GOUZY, J.; OTT, T.; GAMAS, P. Identification of New Potential Regulators of the *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* Symbiosis Using a Large-Scale Suppression Subtractive Hybridization Approach. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 20, n. 3, p. 321–332, 2007

GOULIN, E H.; **Indução de sintoma de Mancha Preta dos Citros em frutos destacados e estudo da Epidemiologia da doença**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013

GUO, M., CHEN, Y., DU, Y., DONG, Y., GUO, W., ZHAI, S., ZHENG, X. The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **PLoS one pathogens**, v.7, n.2, 2011.

HAAS, H. Iron - A Key Nexus in the Virulence of *Aspergillus fumigatus*. **Frontiers in microbiology**, v.3, n.28, 2012.

HAMEL, L.-P., NICOLE, M.-C., DUPLESSIS, S., & ELLIS, B. E. Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers. **The Plant cell**, v.24, n.4, p.1327–51, 2012.

HARTL, L.; ZACH, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.93, p. 533–543, 2012.

HARREN, K. & TUDZYNSKI, B. Cch1 and Mid1 Are Functionally Required for Vegetative Growth under Low-Calcium Conditions in the Phytopathogenic Ascomycete *Botrytis cinerea* **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 5, p. 712–724, 2013.

HAWKSWORTH, D. L.; W. CROUS, P. W.; REDHEAD, S. A.; REYNOLDS, D. R.; SAMSON, R. A.; SEIFERT, K. A.; TAYLOR, J. W.; WINGFIELD, M. J.; ABACI, O.;

AIME, C.; ASAN, A.; BAI, F. Y.; BEER, Z. W.; BEGEROW, D.; BERIKTEN, D.; BOEKHOUT, T.; BUCHANAN, P. K.; BURGESS, T.; BUZINA, W.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CRANE, J. L.; DAMM, U.; DANIEL, H. M.; DIEPENINGEN, A. D.; DRUZHININA, I.; Paul S. DYER, Ursula EBERHARDT, Jack W. FELL, Jens C. FRISVAD, GEISER, D. M.; GEML, J.; GLIENKE, C.; GRÄFENHAN, T.; GROENEWALD, J. Z.; GROENEWALD, M.; GRUYTER, J.; GUÉHO-KELLERMANN, E.; DONGGUO, L.; HIBBETT, D. S.; HONG, B.; HOOG, G. S.; HOUBRAKEN, J.; HUHNDORF, S. M.; HYDE, K. D.; ISMAIL, A.; JOHNSTON, P. R.; KADAIFCILER, D. G.; KIRK, P. M.; KÕLJALG, U.; KURTZMAN, C. P.; LAGNEAU, P. E.; LÉVESQUE, C.; A.; LIU, X. H.; LOMBARD, L.; MEYER, W.; MILLER, A.; MINTER, D. W.; MOHAMMAD, NORVELI, L.; OZERSKAYA, S. M.; ÖZİÇ, R.; PENNYCOOK, S. R.; PETERSON, S. W.; Olga V. PETTERSSON, QUAEDVLIEG, W.; ROBERT, V. A.; RUIBAL, C.; SCHNÜRER, J.; SCHROERS, H. J.; SHIVAS, R.; SLIPPERS, B.; SPIERENBURG, H.; TAKASHIMA, M.; TAŞKIN, E.; THINES, M.; THRANE, U.; UZTAN, A. H.; RAAK, M. I.; VARGA, J.; VASCO, A.; VERKLEY, G.; VIDEIRA, S. I. R.; VRIES, R. P.; WEIR, B. S.; YILMAZ, N.; YURKOV, A.; ZHANG, N. The Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature. **IMA Fungus**, v.02, n. 01, p. 105–112, 2011

HENTSCHEL, U.; STEINERT, M.; HACKER, J. Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. **Trends in microbiology**. v. 8, n. 5, 2000.

HENDRICKS, K. E. M. Effect of Copper on Growth Characteristics and Disease Control of the Recently Introduced *Guignardia citricarpa* on Citrus in Florida. **American Journal of Plant Sciences**, v.04, n.2, p.282–290, 2013.

HOGENHOUT, S. a, VAN DER HOORN, R. a L., TERAUCHI, R., & KAMOUN, S. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. **Molecular plant-microbe interactions** : *MPMI*, v.22, n.2, p.115–22, 2009.

HORBACH, R., NAVARRO-QUESADA, A. R., KNOGGE, W., & DEISING, H. B. When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. **Journal of plant physiology**, v.168, n.1, p.51–62, 2011.

HU, J., JOHNSON, E., & WANG, N. qPCR quantification of pathogenic *Guignardia citricarpa* and non-pathogenic *G. mangiferae* in citrus. **Plant Disease**, p.1–49, 2013 (no prelo).

HYDE, K., & SOYTONG, K.. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, v.33, p. 163-173, 2008.

IDNURM, a, & HOWLETT, B. J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. **Molecular plant pathology**, v.2, n.4, p241–55, 2001.

ISLAM, M. S., HAQUE, M. S., ISLAM, M. M., EMDAD, E. M., HALIM, A., HOSEN, Q. M. M., ... ALAM, M.. Tools to kill: genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. **BMC genomics**, v.13, n.1, p. 493-506, 2012.

KAWAHARA, Y., OONO, Y., KANAMORI, H., MATSUMOTO, T., ITOH, T., & MINAMI, E. Simultaneous RNA-seq analysis of a mixed transcriptome of rice and blast fungus interaction. **PloS one**, v.7, n.11, 2012

Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. **Nature reviews. Microbiology**, v.3, n.12, p937–47, 2005.

KIM, Y. K., KAWANO, T., LI, D., & KOLATTUKUDY, P. E. A mitogen-activated protein kinase kinase required for induction of cytokinesis and appressorium formation by host signals in the conidia of *Colletotrichum gloeosporioides*. **The Plant cell**, v.12, n.8, p1331–43, 2000.

LAHRMANN, U., DING, Y., BANHARA, A., RATH, M., HAJIREZAEI, M. R., DÖHLEMANN, S., ... ZUCCARO, A. Host-related metabolic cues affect colonization strategies of a root endophyte. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.110, n.34, p.13965–13970, 2013.

LANFRANCO, L.; NOVERO, M.; BONFANTE, P. The Mycorrhizal Fungus *Gigaspora margarita* Possesses a CuZn Superoxide Dismutase That Is Up-Regulated during Symbiosis with Legume Hosts. **Plant Physiology**, v. 137, p. 1319–1330, 2005

LIVAK, K. J., & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v.25, n.4, p.402–408, 2001.

MARCET-HOUBEN, M.; BALLESTER, A. R.; LA FUENTE, B.; HARRIES, E.; MARCOS, J. F.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L.; GABALDÓN, T. Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus. **BMC Genomics**, p. 13-646, 2012

MACPHERSON, S., LAROCHELLE, M., & TURCOTTE, B. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v.70, n.3, p.583–604, 2006.

MALAPI-WIGHT, M., SMITH, J., CAMPBELL, J., BLUHM, B. H., & SHIM, W.-B. Sda1, a Cys2-His2 zinc finger transcription factor, is involved in polyol metabolism and fumonisin B1 production in *Fusarium verticillioides*. **PloS one**, v.8, n.7, 2013

MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends in genetics : TIG**, v.24, n.3, p133–41, 2008.

MARQUES, J. P. R., SPÓSITO, M. B., MELLO, A. F. S., AMORIM, L., MONDIN, M., & APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.. Histopathology of black spot symptoms in sweet oranges. **European Journal of Plant Pathology**, v.133, n.2, p.439–448, 2011.

MARTINEZ, D. a, & NELSON, M. A. (2010). The next generation becomes the now generation. **PLoS one genetics**, v.6, n.4, 2010

MERCADO-FLORES, Y., HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C., RUIZ-HERRERA, J., & VILLA-TANACA, L. Proteinases and exopeptidases from the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. **Mycologia**, v.95, nn.2, p.327–39, 1998.

MASQUIO, F. Pinta Preta dos citros. Disponível em: http://www3.servicos.ms.gov.br/iagro_site/palestras%20FUNDECITRUS/Pinta%20Preta.pdf, Acesso em 04, Jan. 2013

MEYER, L., SANDERS, G., JACOBS, R., & KORSTEN, L. A one-day sensitive method to detect and distinguish between the citrus black spot pathogen *Guignardia citricarpa* and the endophyte *Guignardia mangiferae*. **Plant disease**, v.90, n.1, p97-101, 2006.

MILES, a. K., TAN, Y. P., TAN, M. K., DONOVAN, N. J., GHALAYINI, a., & DRENTH, a. *Phyllosticta* spp. on cultivated Citrus in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v.42, n.4, p.461–467, 2013.

MILLER, J. R., KOREN, S., & SUTTON, G. (2010). Assembly algorithms for next-generation sequencing data. **Genomics**, v.95, n.6, p.315–27, 2010.

MOYE-ROWLEY, W. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. **Eukaryotic Cell**, v.2, n3, p. 381-389, 2003.

MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; M. KENERLEY, C. M. Secondary metabolism in *Trichoderma*– a genomic perspective. **Microbiology**, v. 158, p. 35–45, 2012.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific Enzymatic Amplification of DNA *in vitro*: The Polymerase Chain Reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, 1986.

NEVES, M., TROMBIN, V., MILAN, P., & LOPES, F. *O retrato da citricultura brasileira. Ribeirão Preto: 2010.*

NICHOLLS, S., STRAFFON, M., & ENJALBERT, B. Msn2-and Msn4-like transcription factors play no obvious roles in the stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*. **Eukaryotic cell**, v.3, n.5, p- 1111-1123, 2004.

NOWROUSIAN, M. (2010). Next-generation sequencing techniques for eukaryotic microorganisms: sequencing-based solutions to biological problems. **Eukaryotic cell**, v.9, n.9, p.1300–1310, 2010.

NOWROUSIAN, M., STAJICH, J. E., CHU, M., ENGH, I., ESPAGNE, E., HALLIDAY, K., ... FREITAG, M.. De novo assembly of a 40 Mb eukaryotic genome from short sequence reads: *Sordaria macrospora*, a model organism for fungal morphogenesis. **PLoS one genetics**, v.6, n.4, 2010.

O'CONNELL, R. J., THON, M. R., HACQUARD, S., AMYOTTE, S. G., KLEEMANN, J., TORRES, M. F., ... ALKAN, N. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature genetics**, v.44, n.9, p.1060–1065, 2012.

OIDE, S., MOEDER, W., KRASNOFF, S., GIBSON, D., HAAS, H., YOSHIOKA, K., & TURGEON, B. G. NPS6, encoding a nonribosomal peptide synthetase involved in siderophore-mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes. **The Plant cell**, v.18, n.10, p.2836–53, 2006.

OKANE, I.; LUMYONG, S.; NAKAGIRI, A.; ITO, T. Extensive host range of an endophytic fungus, *Guignardia endophyllicola* (anamorph: *Phyllosticta capitalensis*). **Mycoscience**, v.44, p.353–363, 2003.

PASZKOWSKI, U. Mutualism and parasitism: the yin and yang of plant symbioses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 364–370, 2006

PAZOTI, M. A., GARCIA, R. E., CRUZ PESSOA, J. D., & MARTINEZ BRUNO, O. Comparison of shape analysis methods for *Guignardia citricarpa* ascospore characterization. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.8, n.3, p.265–275, 2005.

PERES, N., & HARAKAVA, R. Comparison of molecular procedures for detection and identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. **Plant Disease**, v.91, p.525–531, 2007.

PEROTTO, S. & BALUSKA, F. Signaling and Communication in Plant Symbiosis. **Springer**, v. 1, 2012.

PORTNOY, T.; MARGEOT, A.; LINKE, R.; ATANASOVA, L.; FEKETE, E.; SÁNDOR, E.; HARTL, L.; KARAFFA, L.; DRUZHININA, I. S.; SEIBOTH, B.; Le CROM, S.; P KUBICEK, C. The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. **BMC Genomics**, p. 12:269, 2011.

POSSIEDE, Y., & GABARDO, J. Fungicide resistance and genetic variability in plant pathogenic strains of *Guignardia citricarpa*. **Brazilian Journal of microbiology**, v.40, p.308–313, 2009.

POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M.; SANGLARD, D.; LA SORDA, M.; BOCCIA, S.; ROMANO, L.; MORACE, G.; FADDA, G. Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 2, 357-371, 2003

RAO, M., & TANKSALE, A. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Genetic and molecular biology**, v.62,n.3, 2009.

RAPPUSI, M., & BENATO, E. Chitosan and fungicides on postharvest control of *Guignardia citricarpa* and on quality of Pêra Rio oranges. **Summa Phytopathologica**, v.3, n.3, p142–144, 2011.

RAPPUSI, M., & PASCHOLATI, S. Chitosan reduces infection by *Guignardia citricarpa* in postharvest Valencia oranges. **Brazilian Archives of Brazilian Archives of biology and technology**, v.52, p.513–521, 2009.

REIS, R., TIMMER, L., & GOES, A. Effect of temperature, leaf wetness, and rainfall on the production of *Guignardia citricarpa* ascospores and on back spot severity on sweet orange. **Fitopatologia Brasileira**, v.1, p.29–34, 2006.

ROBERTS, A., PIMENTEL, H., TRAPNELL, C., & PACHTER, L.. Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-Seq. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v.27, n.17, p.2325–2329, 2011.

ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M. **A mancha preta dos frutos: um dos fatores limitantes à produção citrícola do estado do Rio de Janeiro**. Comunicado Técnico. CTAA-EMBRAPA. v.19, p. 1-5, 1995.

RODRIGUES, C. M.; **Expressão diferencial de genes em laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb) e em tangerina (*Citrus reticulata*-blanco) em resposta à infecção por *Xylella fastidiosa***. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2011

RODRIGUES, M. B. C., ANDREOTE, F. D., SPÓSITO, M. B., AGUILLAR-VILDOSO, C. I., ARAÚJO, W. L., & PIZZIRANI-KLEINER, A. A. (2007). Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.3, p.323–327, 2007.

RODRIGUES, M. B. C; **Transformação genética e patogenicidade de *Guignardia citricarpa***. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2010

RODRIGUES, M. B. C., FÁVARO, L. C. D. L., PALLU, A. P. D. S., FERREIRA, A., SEBASTIANES, F. D. S., RODRIGUES, M. J. C., ... PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Agrobacterium-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*: An efficient tool to gene transfer and random mutagenesis. **Fungal Biology**, p.1–13, 2013.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. & BENITO, B. Sodium or potassium efflux ATPase A fungal, bryophyte, and protozoal ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1798, p. 1841–1853, 2010

ROY, A. J. Some fungi from Almora. **Indian Phytopathol**, v. 20, p. 340–348, 1968.

ROMÃO, A S., SPÓSITO, M. B., ANDREOTE, F. D., AZEVEDO, J. L., & ARAÚJO, W. L. Enzymatic differences between the endophyte *Guignardia mangiferae* (Botryosphaeriaceae) and the citrus pathogen *G. citricarpa*. **Genetics and molecular research : GMR**, v.10, n.1, p.243–52, 2011.

SAIER JR, M. H. A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transporters. **Microbiology and molecularbiology reviews**, v. 64, n. 2; p. 354–411, 2000

SAIKI R, K.; SCHARF S; FALOONA F; MULLIS K. B; HORN G. T; ERLICH H. A.; ARNHEIM N., Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, **Science**, V. 20, p.1350-1354, 1985.

SAKALIDIS, M. L. M. **Investigation and analysis of taxonomic irregularities within the botryosphaeriaceae.** Tese (Doutorado). Murdoch University, Perth Western Australia, 2011

SANGLARD, D.; KUCHLER, K.; FISCHER, F.; PAGANI, J. L.; MONOD, M.; BILLE, J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 39, p. 2378–86, 1995

SANGLARD, D.; FISCHER, F.; MONOD, M.; BILLE, J. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC-transporter gene. **Microbiology**, v. 143, n. 02, p. 405–416, 1997

SANGLARD, D.; FISCHER, F.; CALABRESE, D.; MAJCHERCZYK, P. A.; BILLE, J. The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 43, p. 2753–65, 1999

SANGLARD, D. Diagnosis of Antifungal Drug Resistance Mechanisms in Fungal Pathogens: Transcriptional Gene **Regulation.** **Current Fungal Infection Report**, v.5, p. 157–167, 2011.

SCAZZOCCHIO, C.; The fungal GATA factors. **Current Opinion in Microbiology.** V.3 n.2 p. 126–131, 2000

SCHENA, L., NIGRO, F., IPPOLITO, A., & GALLITELLI, D. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v.110, n.9, p.893–908, 2004.

SCHINOR, E. Colonização de folhas de laranjeira-Pera e variedades afins por *Guignardia citricarpa*. **Fitopatologia brasileira**, v.27, n.5, p. 479–483, 2002.

SCHUBERT, T. Citrus black spot (*Guignardia citricarpa*) discovered in Florida. Pest Alert. **Florida Department of Agriculture and Consumer Services**, 2010

SCHUTTE, G., & MANSFIELD, R. (2003). Application of azoxystrobin for control of benomyl-resistant *Guignardia citricarpa* on 'Valencia' oranges in South Africa. **Plant disease**, p.784–788, 2003.

SHELEST, E.. Transcription factors in fungi. **FEMS microbiology letters**, v.286, n.2, p.145–51, 2008.

SCHOCH, C. L.; SHOEMAKER, R. A.; SEIFERT, K. A.; HAMBLETON, S.; SPATAFORA, J. W.; CROUS, P. W. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. **Mycologia**, v. 98, p. 1041–1052, 2006.

SILVA, T. M. **Rna dupla fita em guignardia citricarpa e estimativa do número de cromossomos em G. Citricarpa, G. Mangiferae E Phyllosticta spinarum.** Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008

- SHOKRALLA, S., SPALL, J. L., GIBSON, J. F., & HAJIBABAEI, M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. **Molecular ecology**, v.21, n8, p.1794–805, 2012.
- SOANES, D. M., ALAM, I., CORNELL, M., WONG, H. M., HEDELER, C., PATON, N. W., ... TALBOT, N. J. Comparative genome analysis of filamentous fungi reveals gene family expansions associated with fungal pathogenesis. **PloS one**, v.3, n.6, 2008.
- SPANU, P. D., ABBOTT, J. C., AMSELEM, J., BURGIS, T. A, SOANES, D. M., STÜBER, K., ... GURR, S. J. Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. **Science**, v.330, n.6010, p.1543– 1546, 2010.
- STANKE, M., STEINKAMP, R., WAACK, S., & MORGENSTERN, B. AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes. **Nucleic acids research**,v.32, p. 309-323, 2004
- STERGIOPOULOS, I., COLLEMARE, J., MEHRABI, R., & DE WIT, P. J. G. M. Phytotoxic secondary metabolites and peptides produced by plant pathogenic Dothideomycete fungi. **FEMS microbiology reviews**, v.37, n.1, p.67–93, 2013.
- STRINGARI, D.; **Sistemática e diversidade de isolados de *Guignardia spp.* e *Phyllosticta spp.* nos estados do Paraná e São Paulo.** Tese (Doutorado) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009
- SURYANARAYANAN, T. S., THIRUNAVUKKARASU, N., GOVINDARAJULU, M. B., SASSE, F., JANSEN, R., & MURALI, T. S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v.23, n.2, p.9–19, 2009.
- TEICHMANN, B.; LIU, L.; SCHINK, K. O. BÖLKER, M. Activation of the Ustilagic Acid Biosynthesis Gene Cluster in *Ustilago maydis* by the C₂H₂ Zinc Finger Transcription Factor Rual. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, n. 8, p. 2633-2640, 2010.
- TOFFANO, L.; **Efeito dos extratos de albedo de *Citrus sinensis*, *Letinula edodes*, *Agaricus blazei* e dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* no controle da Mancha Preta dos Citros.** Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2010
- THAKUR, K., CHAWLA, V., BHATTI, S., SWARNKAR, M. K., KAUR, J., SHANKAR, R., & JHA, G. De novo transcriptome sequencing and analysis for *Venturia inaequalis*, the devastating apple scab pathogen. **PloS one**, v8, n.1, 2013.
- THOMMA, B. P. H. J., NÜRNBERGER, T., & JOOSTEN, M. H. A J. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. **The Plant cell**, v.23, n.1, p4–15, 2011.
- TIMOSSI, A. J.; GOES, A.; KUPPER, K.C.; BALDASSARI, R. B.; REIS, R. F. Influência da Temperatura e da Luminosidade no Desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, Agente Causal da Mancha Preta dos Frutos Cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p489–494, 2003.

TRAPNELL, C.; WILLIAMS, B. A.; PERTEA, G.; MORTAZAVI, A.; KWAN, G.; VAN BAREN, W. J.; SALZBERG, S. L.; WOLD, B. J.; and L. P. Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. **National Biotechnology**, v.28, n5, p.511–515, 2010.

TRAPNELL, C., PACHTER, L., & SALZBERG, S. L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, v.25, n.9, p.1105–1111, 2009.

TUDZYNSKI, P., & SHARON, A. Fungal pathogenicity genes. **Applied mycology and biotechnology**, p.1–27, 2003.

URBAN, M., BHARGAVA, T., & HAMER, J. E. An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. **The EMBO journal**, v.18, n.3, p.512–521, 1999.

VAN GENT-PELZER, M. P. E., VAN BROUWERSHAVEN, I. R., KOX, L. F. F., & BONANTS, P. J. M. A TaqMan PCR Method for Routine Diagnosis of the Quarantine Fungus *Guignardia citricarpa* on Citrus Fruit. **Journal of Phytopathology**, v.155, n.6, p.357–363, 2007.

VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A., & SPELEMAN, F.. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v.3, n.7, 2002.

VANGUILDER, H. D., VRANA, K. E., & FREEMAN, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **BioTechniques**, v.44, n.5, p.619–26, 2008.

VARMA, A.; FEKETE, A.; SRIVASTAVA, A.; SAXENA, A. K.; FROMMBERGER, M.; LI, D.; GSCHWENDTER, S.; SHERAMETI, I.; OELMUELLER, R.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; TRIPATHI, S.; HARTMANN, A. Inhibitory Interactions of Rhizobacteria with the Symbiotic Fungus *Piriformospora indica* In: VARMA, A.; KOST, G.; OELMÜLLER, R. *Piriformospora indica*: Sebacinales and Their Biotechnological Applications. Soil Biology series, v. 33, **Springer**, 2013.

VIDENTE, A. N. E., IMMINO, A. L. C., NDOLFI, A. N. N. A. A., URRO, M. A. V, ANIMALI, P., II, F., ... FEDERICO, N. Produced by *Phyllosticta cirsii* , a Potential Mycoherbicide for *Cirsium arvense* **Biocontrol**, p.884–888, 2008.

WAHL, R., WIPPEL, K., GOOS, S., KÄMPER, J., & SAUER, N. A novel high-affinity sucrose transporter is required for virulence of the plant pathogen *Ustilago maydis*. **PLoS one biology**, v.8,n.2, 2010.

WALBOT, V.& SKIBBE, D. S. Maize host requirements for *Ustilago maydis* tumor induction. **Sexual Plant Reproduction**, v. 23, n. 1, p 1-13, 2010.

WANG, B., GUO, G., WANG, C., LIN, Y., WANG, X., ZHAO, M., PAN, L. Survey of the transcriptome of *Aspergillus oryzae* via massively parallel mRNA sequencing. **Nucleic acids research**, v.38, n.15, p.5075–5087, 2010.

- WANG, X., CHEN, G., HUANG, F., ZHANG, J., HYDE, K. D., & LI, H. (2011). *Phyllosticta* species associated with citrus diseases in China. **Fungal Diversity**, v.52, n.1, p.209–224, 2011.
- WICKERT, E., DE MACEDO LEMOS, E. G., KISHI, L. T., DE SOUZA, A., & DE GOES, A. (2012). Genetic diversity and population differentiation of *Guignardia mangiferae* from “Tahiti” acid lime. **The Scientific World Journal**, v.2012, 2012.
- WIKKEE, S., LOMBARD, L., CROUS, P. W., NAKASHIMA, C., MOTOHASHI, K., CHUKEATIROTE, E., HYDE, K. D. *Phyllosticta capitalensis*, a widespread endophyte of plants. **Fungal Diversity**, v.60, n.1, p.91–105, 2013a.
- WIKKEE, S.; LOMBARD, L.; NAKASHIMA, C.; MOTOHASHI, K.; CHUKEATIROTE, E.; CHEEWANGKON, R.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D.; CROUS, P. W. A phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (Botryosphaerales). **Studies in Mycology**, v. 76, p. 1-29, 2013b.
- WIKKEE, S., UDAYANGA, D., CROUS, P. W., CHUKEATIROTE, E., MCKENZIE, E. H. C., BAHKALI, A. H., ... HYDE, K. D. *Phyllosticta*—an overview of current status of species recognition. **Fungal Diversity**, v.51, n.1, p.43–61, 2011.
- WILSON, R. A, GIBSON, R. P., QUISPE, C. F., LITTLECHILD, J. A, & TALBOT, N. J. An NADPH-dependent genetic switch regulates plant infection by the rice blast fungus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.107, n.50, p.21902–21907, 2010.
- WOUW, A. VAN DE, & HOWLETT, B. Fungal pathogenicity genes in the age of “omics.” **Molecular plant pathology**, v.12, p.507–514, 2011.
- WULANDARI, N. F., TO-ANUN, C., HYDE, K. D., DUONG, L. M., DE GRUYTER, J., MEFFERT, J. P., CROUS, P. W. (2009). *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of Citrus maxima in Asia. **Fungal Diversity**, v.34, p.23–39, 2009.
- XU, J.-R., PENG, Y.-L., DICKMAN, M. B., & SHARON, A. (2006). The dawn of fungal pathogen genomics. **Annual review of phytopathology**, v.44, p.337–366, 2006.
- YIN, W.; & KELLER N. P. Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. **The journal of microbiology**. V.49, n. 3, p. 329-339, 2011
- YU, J. H. & KELLER, N. Regulation of Secondary Metabolism in Filamentous Fungi **Annual Review of Phytopathology**. v. 43, p. 437-458, 2005
- YU, H.-Y., SEO, J.-A., KIM, J.-E., HAN, K.-H., SHIM, W.-B., YUN, S.-H., & LEE, Y.-W. Functional analyses of heterotrimeric G protein G alpha and G beta subunits in *Gibberella zeae*. **Microbiology**, v.154, p.392–401, 2008.
- ZHANG, J., CHIODINI, R., BADR, A., & ZHANG, G. (2011). The impact of next-generation sequencing on genomics. **Journal of Genetics and Genomics**, v.38, n.3, p.95–109, 2011.

ZHANG, N.; ZHANG, S.; BORCHERT, S.; RICHARDSON, K.; SCHMID, J. High Levels of a Fungal Superoxide Dismutase and Increased Concentration of a PR-10 Plant Protein in Associations Between the Endophytic Fungus *Neotyphodium loliae* and Ryegrass. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 24, n. 8, pp. 984–992, 2011

ZHAO, Z., LIU, H., WANG, C., & XU, J.-R.. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. **BMC genomics**, v.14, n.1, p.274-288, 2013.

ZHU, J.; YU, X.; XIE, BB.; GU, X.; ZHANG, Z.; LI, S. Transcriptomic profiling-based mutant screen reveals three new transcription factors mediating menadione resistance in *Neurospora crassa*. **Fungal Biology** v. 17, p. 422-430, 2013

8. ANEXOS