

## INTRODUÇÃO

A vassoura de bruxa é uma doença do cacau que tem como agente etiológico o fungo *Moniliophthora perniciosa*. Estudos com outros organismos fitopatogênicos mostraram que a descoberta de genes exclusivos de patógenos é de extrema importância na busca por métodos de controle de doenças. Alguns desses genes podem estar ligados à patogenicidade do organismo e codificar proteínas extracelulares, pequenas e ricas em cisteína. Essas proteínas podem ser cruciais para a instalação da doença em plantas suscetíveis, mas também podem provocar resposta defensiva em plantas resistentes. Desse modo, acreditamos que o estudo destas proteínas exclusivas de *M. perniciosa* possa ajudar no controle da doença vassoura de bruxa.

## OBJETIVOS

O principal objetivo do projeto foi descobrir novos genes exclusivos do fungo *Moniliophthora perniciosa* e montar uma biblioteca com esses genes. Para isso nos baseamos em modelos de genes fornecidos por programas computacionais de predição gênica.

## MATERIAL E MÉTODOS

Selecionamos modelos de genes com características comuns a genes de patogenicidade típicos de outros fitopatógenos como: a) presença de peptídeo sinal para exportação, b) alta porcentagem de resíduos de cisteína (conferem estabilidade à proteína) e c) proteína hipotética de tamanho reduzido. Desenhamos dois grupos de primers para esses modelos gênicos, o primeiro contendo a seqüência indicada como peptídeo sinal e o segundo contendo a seqüência à frente do peptídeo sinal (proteína madura). Cultivamos o fungo em meios contendo glicose ou extrato de cacau como fontes de carbono, extraímos RNA total do fungo e então sintetizamos cDNA. Validamos e confirmamos a expressão dos genes novos por meio de técnicas de RT-PCR. Em seguida, clonamos os cDNAs dos novos genes em vetores de replicagem para que posteriormente eles sigam para testes de funcionalidade. A metodologia aplicada ao projeto encontra-se ilustrada na Figura 1.

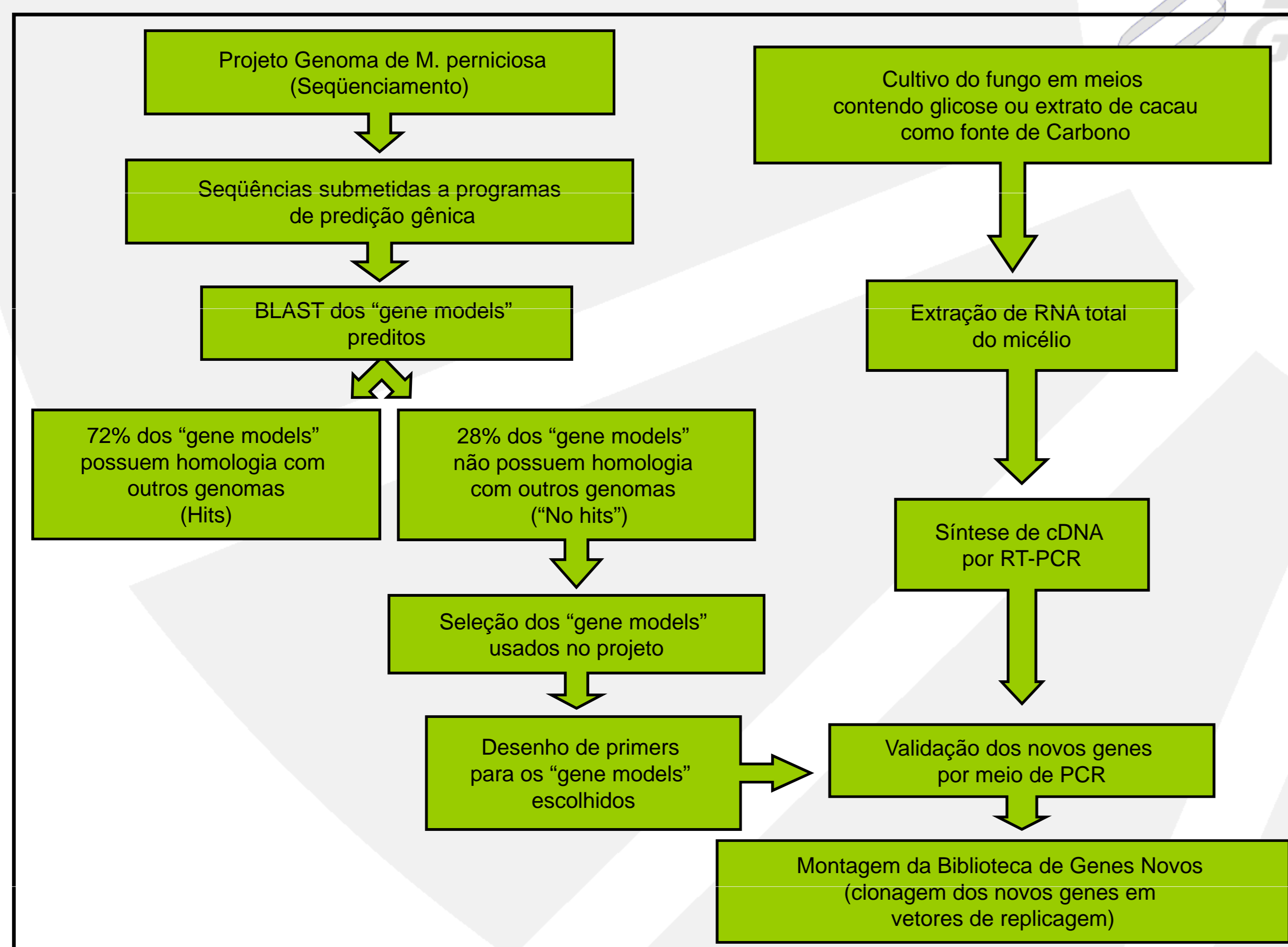


Figura 1. Pipeline do projeto.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seleção dos modelos de genes preditos resultou em 22 modelos que continham as características desejadas. Destes 22, 14 modelos gênicos tiveram sua expressão confirmada, sendo então validados e estão em fase de clonagem. Até o momento temos quatro genes já clonados em vetores de replicagem, formando a biblioteca de genes novos.

A maior parte dos genes validados foram expressos em micélio crescido em meio contendo glicose como fonte de carbono (Figura 2). Entretanto um pequeno número de genes mostrou-se expresso também em meio contendo extrato de cacau como fonte de carbono (Figura 3).

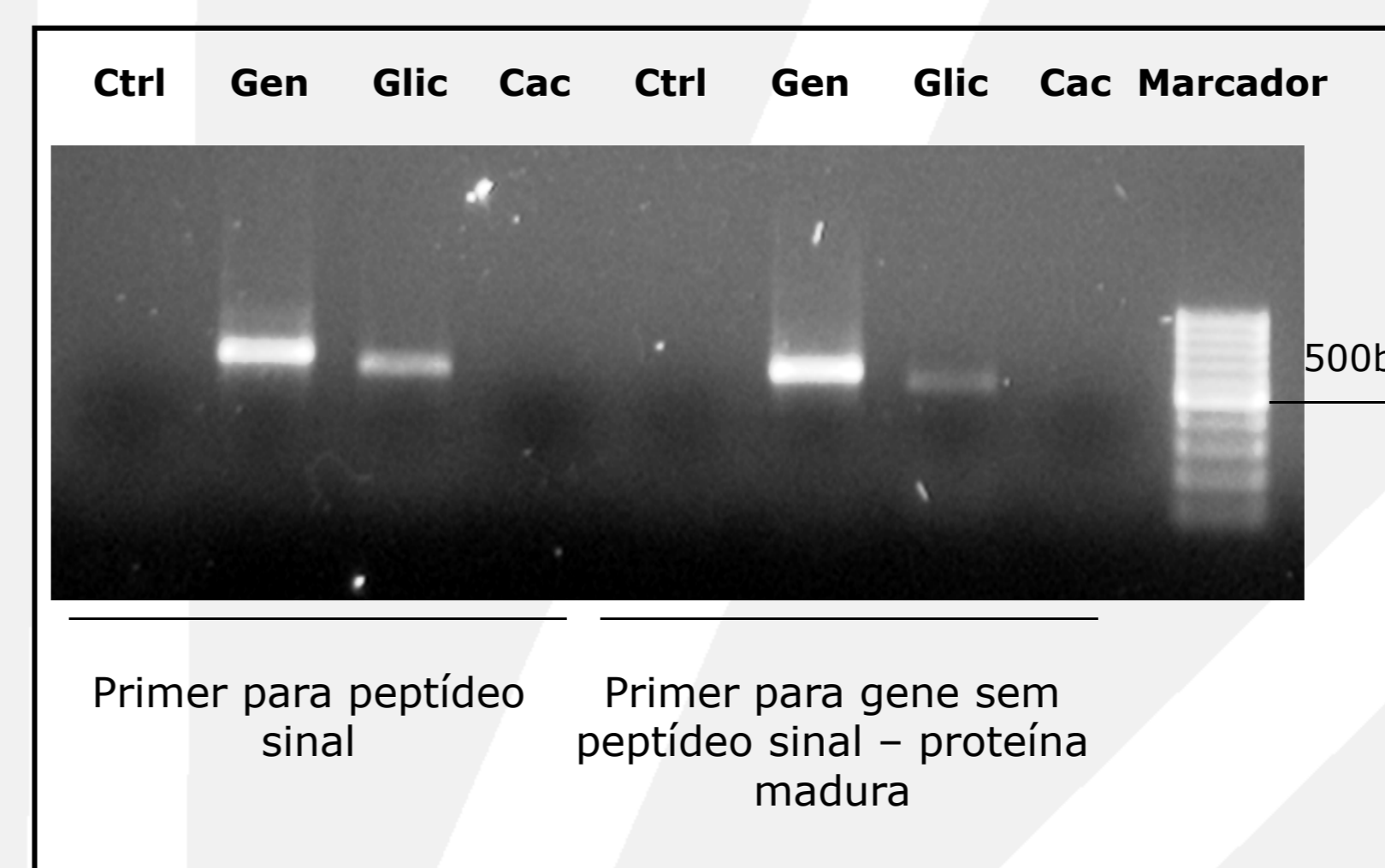


Figura 2. Gel de agarose contendo o resultado das amplificações de gene expresso em meio com glicose. A linha indica o fragmento de 500 pares de base do Marcador Gene Ruler 100bp DNA Ladder (Fermentas).

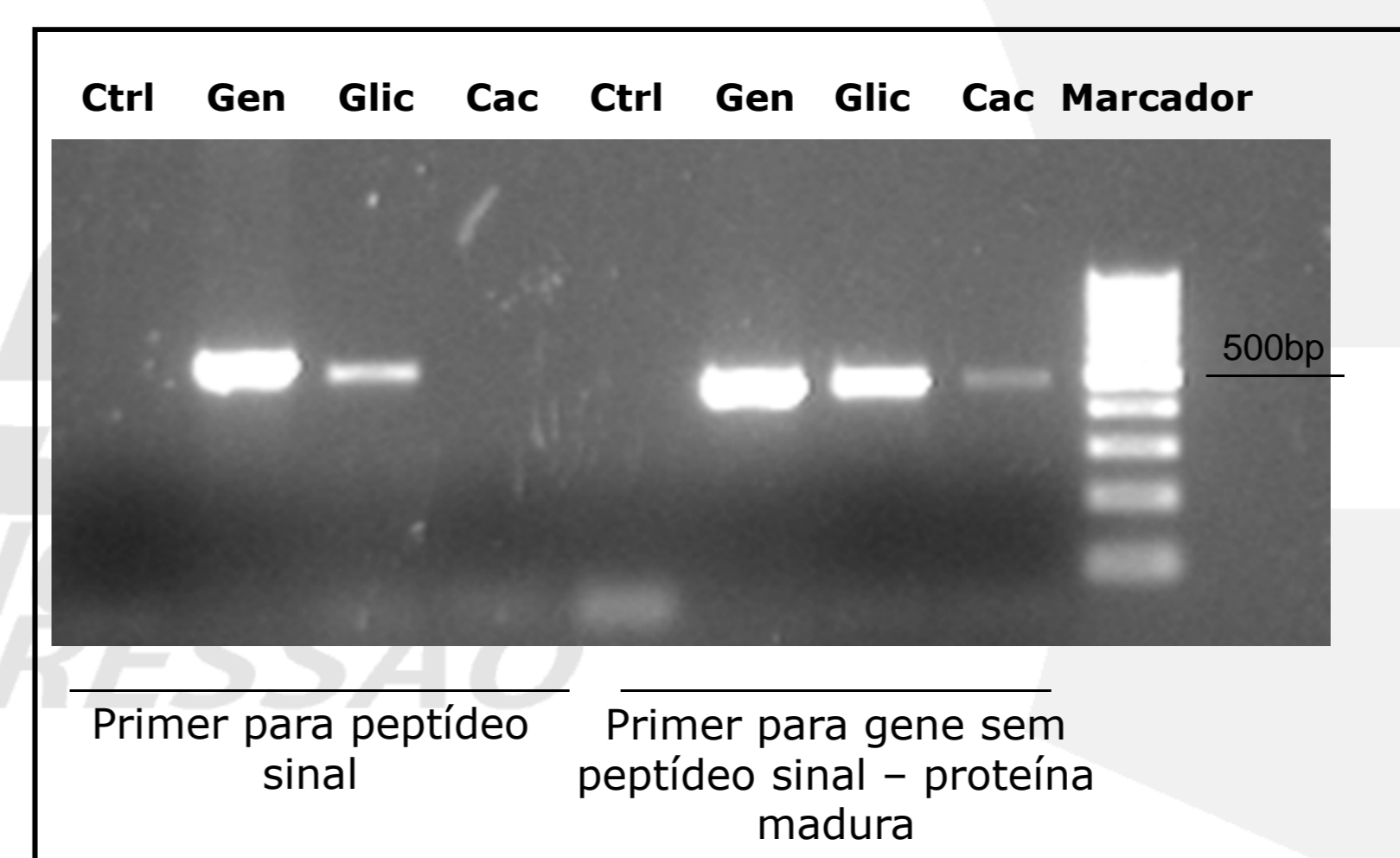


Figura 3. Gel de agarose contendo o resultado das amplificações de gene expresso tanto em meio com glicose, como em meio com cacau como fontes de carbono. A linha indica o fragmento de 500 pares de base do Marcador Gene Ruler 100bp DNA Ladder (Fermentas).

### Legenda:

**Ctrl**  
controle negativo da reação de PCR

**Gen**  
DNA genômico como template da PCR

**Glic**  
cDNA de micélio crescido em meio com glicose como template da reação

**Cac**  
cDNA de micélio crescido em meio com cacau como template da reação

## CONCLUSÕES

A importância da identificação de genes únicos de um organismo é notável, e a relevância do presente trabalho está em validar a existência de genes em *Moniliophthora perniciosa* nunca antes caracterizados em nenhum outro fitopatógeno. A expressão de alguns desses genes em meio contendo extrato de cacau pode fornecer evidências acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na interação planta-patógeno. Estudos posteriores devem ser realizados a fim de elucidar as funções específicas desses genes.