

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**EXPRESSÃO DE GENES POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA
PATOGENICIDADE DE *Aspergillus niger* AO SISAL**

ELIANE SANTOS JESUS

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
MARÇO - 2013**

**EXPRESSÃO DE GENES POTENCIALMENTE
ENVOLVIDOS NA PATOGENICIDADE DE *Aspergillus niger* AO
SISAL**

ELIANE SANTOS JESUS

Bacharel em Biologia na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010.

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Dr. Jorge Teodoro de Souza

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
MARÇO, 2013**

FICHA CATALOGRÁFICA

J58

Jesus, Eliane Santos.

Expressão de genes potencialmente envolvidos na patogenicidade de *Aspergillus niger* ao sisal / Eliane Santos Jesus. – Cruz das Almas, BA, 2013.

48f.; il.

Orientador: Jorge Teodoro de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Sisal – Controle biológico. 2.Sisal – Fungos fitopatogênicos. 2.Enzimas – Genética – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 633.577

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
Eliane Santos Jesus**

Dr. Jorge Teodoro de Souza
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
(Orientador)

Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque
Universidade Federal da Bahia - UFBA

Dr. Juan Manuel Anda Rocabado
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
MARÇO, 2013**

Deus e à minha Família,
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao grandioso Deus, por ter me dado o dom da vida.

Aos meus pais, Everaldo e Rosália, por estarem sempre presentes nos momentos difíceis, me aconselhando e dando força.

Às minhas irmãs e amigas, Dalila e Camila, pelo apoio, paciência e amor durante estes dois anos da minha vida.

A Tiago, pelo amor, compreensão e apoio nestes dois anos.

As minhas amigas, Jackeline Pereira Andrade (Jack), Shirley Nascimento Costa (Shiu), Eliana Maria Rocha Sousa (Ane) e Luciana Silva Almeida (Lu), agradeço eternamente. Muito obrigada por vocês fazerem parte da minha vida.

As meninas da república (Juliana, Juanilis, Quênia e Paula) pelos momentos de alegria compartilhados.

Aos amigos do mestrado, pelo companheirismo nos bons e maus momentos do curso.

A Patrícia Oliveira dos Santos, técnica do laboratório de Genética Microbiana da UFRB, pelo auxílio e amizade.

Aos colegas do laboratório pela amizade e ótima convivência.

A Adailson Feitoza de Jesus Santos, pelo ensinamento e disponibilidade durante a realização das atividades.

Ao meu orientador Jorge Teodoro de Souza, pela oportunidade de aprendizagem e crescimento profissional.

A CAPES pela concessão da bolsa.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pelo espaço físico.

A todos, que contribuíram com a concretização desse trabalho.

"De tudo ficam três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando
A certeza de que é preciso continuar
E a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminarmos.
Devemos fazer da interrupção um caminho novo,
Da queda um passo de dança,
Do medo uma escada,
Do sonho uma ponte."
(Fernando Sabino)

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO10

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA11

A cultura do sisal (*Agave sisalana*)11

A podridão vermelha do caule do sisal13

Aspergillus niger14

Interação planta-patógeno16

Enzimas hidrolíticas17

Ocratoxina A18

Capítulo 1: Expressão de enzimas hidrolíticas e ocratoxina A em uma simulação *in vitro* da interação entre *Aspergillus niger* e sisal.....21

Resumo.....22

Abstract.....23

Introdução.....24

Materiais e métodos.....25

Resultados.....27

Discussão.....30

Capítulo 2: Interação *Aspergillus niger* x sisal: tentativas de estudo da expressão de genes potencialmente envolvidos na patogenicidade e na defesa das plantas contra o fungo.....33

Resumo.....34

Abstract.....35

Introdução.....36

Materiais e métodos.....37

Resultados e Discussão.....39

CONSIDERAÇÕES FINAIS42

REFERÊNCIAS.....43

RESUMO

Jesus, E. S. Expressão de genes potencialmente envolvidos na patogenicidade de *Aspergillus niger* ao sisal

O sisal (*Agave sisalana*) é uma das poucas plantas capazes de sobreviver às condições edafoclimáticas da região semi-árida do Nordeste brasileiro. O sisal proporciona a obtenção de renda para milhares de famílias. No entanto, observa-se um declínio da cultura do sisal devido à podridão vermelha do caule do sisal, doença causada pelo fungo *Aspergillus niger*. Este trabalho tem como objetivo estudar a expressão de cinco genes do fungo potencialmente ligados a patogenicidade a plantas de sisal por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Estes genes compreendem quatro enzimas hidrolíticas (celulase, cutinase, protease e lipase) e a micotoxina ocratoxina A. A dissertação é constituída de uma revisão de literatura e dois capítulos. A revisão de literatura contém dados sobre o sisal, podridão vermelha do caule do sisal, enzimas hidrolíticas e ocratoxina A. No primeiro capítulo estudou-se a expressão de genes potencialmente envolvidos na interação entre *A. niger* e sisal em condições simuladas da interação *in vitro*. *Primers* para enzimas hidrolíticas e ocratoxina A foram desenhados e otimizados para qPCR. Observou-se maior expressão dos genes em meio suplementado com extrato de sisal do que em meio mínimo. No segundo capítulo foram feitas tentativas de se estudar a expressão de genes potencialmente envolvidos na patogenicidade de *A. niger* e genes de defesa de sisal contra o fungo em condições *in vivo*. No entanto, devido à ineficiência dos *primers* dos genes de defesa e ausência do material genético do fungo, a amplificação dos genes nas amostras *in vivo* não pode ser realizada com sucesso. Outros estudos serão realizados para a otimização da extração de RNA da interação entre *A. niger* e sisal. Os dados apresentados são os primeiros a abordar os mecanismos de patogenicidade de *A. niger* ao sisal.

Palavras-chave: *Agave sisalana*, enzimas hidrolíticas, ocratoxina A, fungo fitopatogênico e PCR em tempo real.

ABSTRACT

Jesus, E. S. Expression of genes putatively involved in the pathogenicity of *Aspergillus niger* to sisal

Sisal (*Agave sisalana*) is one of the few plants able to survive the conditions of the Brazilian Semi-arid Northeast region. This crop allows thousands of people to obtain minimal wages. However, there is a decline of the crop caused by the fungus *Aspergillus niger*. The objective of this work was to study the expression of five *A. niger* genes putatively involved in the pathogenicity to sisal through quantitative real time PCR (qPCR). These genes comprise four hydrolytic enzymes (cellulase, cutinase, protease and lipase) and the mycotoxin ochratoxin A. The dissertation is composed of one literature review and 2 chapters. The literature review contains information about sisal, the bole rot disease, hydrolytic enzymes and ochratoxin A. In the first chapter the expression of genes potentially involved in the pathogenicity of *A. niger* to sisal were studied in an *in vitro* simulated interaction. Primers for hydrolytic enzymes and ochratoxin A were designed and optimized for qPCR. Higher expression of all genes was observed in medium supplemented with sisal extract than in the minimal medium. In the second chapter an attempt to study the expression of genes putatively involved in pathogenicity of *A. niger* and in the defense of sisal plants against the fungus in *in vivo* conditions. However, it was not possible to amplify the target genes due to primer inefficiency or lack of fungal DNA. Other studies will be carried out in the future to optimize the extraction of RNA from the interaction. These data are the first to focus on the mechanisms of pathogenicity of *A. niger* to sisal.

Keywords: *Agave sisalana*, hydrolytic enzymes, ochratoxin A, phytopathogenic fungus, quantitative real time PCR.

INTRODUÇÃO

O sisal é cultivado em ampla escala nas regiões semi-áridas do nordeste brasileiro. Nessas regiões, milhares de pessoas trabalham com o sisal, desde a sua produção ao beneficiamento e comercialização de seus produtos, constituindo-se na principal fonte de renda familiar. Além de permitir a fixação do homem no meio rural (SUINAGA et al., 2006).

Apesar da importância do sisal para as famílias nordestinas, tem se observado uma decadência da cultura nos últimos anos. A podridão vermelha do caule do sisal, doença causada por *Aspergillus niger*, tem ameaçado a sustentabilidade desta cultura.

A capacidade de penetração e colonização do patógeno depende do estado em que se encontra o hospedeiro. Segundo Lima et al. (1998), o patógeno necessita de lesões de origem mecânica ou fisiológica para iniciar o processo de infecção. Alguns fitopatógenos produzem enzimas hidrolíticas (PASCHOLATI, 1995) e toxinas (AMORIM, 1995) para penetrar e crescer no interior do hospedeiro. Esses compostos são requeridos para degradar componentes da parede celular dos vegetais. Enzimas que hidrolizam lipídeos e proteínas, como lipases, proteases, cutinases e celulasas são conhecidas, mas o papel na patogenicidade de *A. niger* em sisal ainda não foi estudado.

Alguns isolados de *A. niger* produzem toxinas, como a ocratoxina A (OTA), uma micotoxina cancerígena (ABARCA et al., 1994). No entanto, a relação desta micotoxina com a patogenicidade de *A. niger* em sisal ainda não foi investigado.

Este estudo tem como objetivo investigar a relação de enzimas hidrolíticas como lipases, proteases, cutinases e celulasas e a micotoxina OTA na patogenicidade de *Aspergillus niger* ao sisal. Para tal, a expressão desses genes, potencialmente envolvidos na patogênese, foi analisada por meio da técnica de PCR em tempo real.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Cultura do Sisal

O sisal (*Agave sisalana*) é uma monocotiledônea pertencente à família *Agavaceae*, subfamília *Agavoidea* (BELTRÃO, 2006). Esta planta floresce apenas uma vez durante o ciclo vegetativo (SILVEIRA, 2009). Possuem folhas lanceoladas, com pontas afiadas, destituídas de pecíolos, podendo medir aproximadamente dois metros de comprimento (Figura 1). Os estômatos estão em criptas e as flores são hermafroditas (CANTALINO et al., 2007).

A planta de sisal apresenta metabolismo fotossintético do tipo CAM, abrindo os estômatos à noite, para se beneficiar do orvalho e não perder água via transpiração durante o dia. Esta planta se desenvolve bem em locais com altitude de até 600 m e regime de precipitação pluvial de 450 a 1200 mm/ano (BELTRÃO, 2006). Possui adaptação às regiões tropicais e subtropicais, suportando secas prolongadas e temperaturas elevadas (SILVA et al., 2008).

Originário da península de Yucatan, no México, o sisal é amplamente cultivado nos continentes americano, africano e asiático (BISANDA e ANSELL, 1992). Entretanto, a sua maior concentração está na América Latina. O Brasil é o maior produtor da fibra de sisal do mundo, com mais de 60% da produção mundial. No Brasil a produção de sisal concentra-se na região nordeste, onde a Bahia é o maior produtor, seguido por Paraíba e Rio Grande do Norte (SUINAGA et al., 2006). Segundo informações da Conab (2008), a Bahia, que é responsável por 94% da produção nacional de sisal, possui mais de 20 mil famílias de agricultores que têm no cultivo do sisal, a sua principal fonte de renda (SUINAGA et al., 2006).

A cultura do sisal é de fundamental importância para a economia de vários municípios no semi-árido nordestino, visto que estas regiões de solos secos não apresentam alternativa para exploração de outras culturas e quando apresentam, as mesmas são limitadas.

O sisal possui a principal fibra dura produzida no mundo, correspondendo a aproximadamente 58% da produção comercial e 70% da exportação (SINDIFIBRAS, 2012). A fibra do tipo dura, com elevados teores de

celulose e lignina, é utilizada em inúmeras aplicações, tais como fabricação de artesanatos, na indústria automotiva, de móveis e de eletrodomésticos (ALVES e SANTIAGO, 2005).

A fibra de sisal é uma importante fonte de divisas no Estado da Bahia, onde, por meio de sua exportação e/ou comercialização interna, rende cerca de 80 milhões de dólares em divisas para o Brasil, além de gerar mais de meio milhão de empregos na sua cadeia de serviços, que começa com as atividades de manutenção das lavouras, colheita, desfibramento e beneficiamento da fibra e termina com a industrialização e a confecção de artesanato (SINDIFIBRAS, 2012).

Apesar da relevância da cultura do sisal, tem se constatado nos últimos anos um declínio contínuo, expresso em reduções da área cultivada e na produtividade. Inúmeros fatores têm contribuído para esta decadência, dentre os quais, o baixo índice de aproveitamento das plantas de sisal, a concorrência com as fibras sintéticas, e nos últimos anos a podridão vermelha do caule do sisal, doença que tem ameaçado ainda mais a sustentabilidade desta cultura (ALVES et al., 2004).

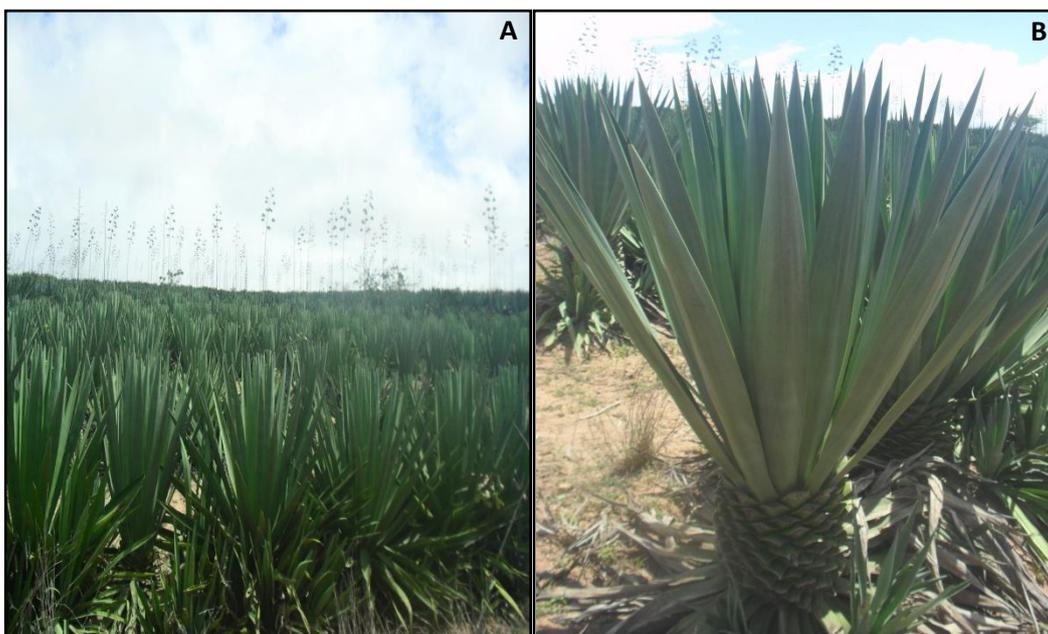


Figura 1. Plantio de sisal no semi-árido nordestino. Aspecto geral de uma plantação de sisal mostrando as flechas lançadas no florescimento **(a)**; Detalhe das folhas de uma planta de sisal **(b)**. Fotos: Adailson Feitoza de Jesus Santos.

Podridão vermelha do caule do sisal

O sisal é uma planta rústica, com uma epiderme foliar composta por uma cutícula espessa e cerosa, o que lhe confere uma barreira natural à penetração de microrganismos patogênicos. Mesmo assim, a planta apresenta suscetibilidade ao fungo *A. niger*, que causa a doença conhecida como podridão vermelha do caule do sisal (BOCK, 1965; MEDINA, 1954).

A podridão vermelha do caule do sisal apareceu pela primeira vez no Brasil no Estado da Paraíba, segundo dados de Machado (1951), citado por Medina (1954). Na Bahia, foi constatada pela primeira vez por pesquisadores da Embrapa Semi-Árido e EBDA, na fazenda Mandacaru, município de Santaluz, BA, em um plantio comercial de 500 hectares de sisal (LIMA et al., 1998).

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento significativo na incidência da podridão vermelha do caule do sisal na Bahia, resultando em perdas consideráveis para os produtores. Esta doença tem preocupado os produtores de sisal devido à alta capacidade de destruição. Destaca-se como o principal problema fitossanitário da cultura no Brasil. As folhas das plantas afetadas tornam-se impróprias para o desfibramento e as plantas morrem com o progresso da doença. O escurecimento gradativo dos tecidos internos do caule (Figura 2b) caracteriza a doença. As áreas afetadas variam da coloração parda ao vermelho e se estendem da base do caule à base da folha da planta (Figura 2c) (COUTINHO et al., 2006; SUINAGA et al., 2006).

Em plantas com estádios avançados da doença, as folhas se tornam amareladas e o caule completamente apodrecido (Figura 2d). Embora seja fatal, plantas de sisal infectadas pelo patógeno podem sobreviver por algum tempo. Isso se deve a colonização lenta peculiar do agente etiológico. A podridão vermelha do caule afeta plantas de sisal em todos os estágios fenológicos, desde brotos a plantas no final do ciclo (BOCK, 1965; SILVA et al., 2008).

Ainda não existem métodos de controle eficazes contra a podridão vermelha do caule do sisal. No entanto alguns grupos de pesquisa no Brasil estão estudando o patossistema, assim como os métodos e medidas mais adequadas para garantir a sustentabilidade da cultura.



Figura 2. Planta de sisal sadia e com sintomas da podridão vermelha. Planta sadia **(a)**; Planta doente com escurecimento gradativo dos tecidos internos do caule **(b)**; Coloração vermelha que se estende do caule para a base das folhas **(c)**; Planta morta com caule apodrecido **(d)**.

Aspergillus niger

Aspergillus niger é um fungo mitospórico, pertencente ao filo *Ascomycota* e ordem *Moniliales*. Esses fungos são cosmopolitas e possuem capacidade de se desenvolver em uma ampla gama de substratos (ABARCA et al., 2004). Seus esporos são facilmente dispersos e estão geralmente associados a materiais orgânicos e ao solo. Crescem em ampla faixa de temperatura e pH, variando de 6 a 47 °C, com uma temperatura ótima de 35-37 °C e 1,4 a 9,8 de pH (SCHUSTER et al., 2002).

Aspergillus niger geralmente é classificado como saprófita, no entanto, pode ser considerado um patógeno oportunista. Isso se deve ao fato de depender de lesões de origem mecânica ou fisiológica e de condições ambientais adversas no hospedeiro para iniciar o processo de infecção (SILVA et al., 2006).

O fungo possui grande importância industrial devido à capacidade de produzir enzimas e ácidos orgânicos para o consumo humano (VARGA et al., 2000). Esta espécie recebeu o *status* de GRAS (*generally regarded as safe*), conferido pela *Food and Drug Administration* (FDA), apesar de produzir ocratoxina A (OTA), uma potente nefrotoxina, carcinogênica a humanos, em baixas quantidades (ABARCA et al., 1994). Esses microorganismos contaminam vários produtos agrícolas, durante os estágios de pré-colheita, colheita, armazenamento e processamento (PERRONE et al., 2007). Diversos produtos agrícolas foram relatados contaminados por OTA, incluindo derivados de uva e café (PITT, 2000). Desta forma, é importante se certificar que os isolados industriais não sejam produtores desta micotoxina.

Apesar da importância industrial, *A. niger* pode provocar deterioração dos alimentos e podridão pós - colheita, durante a fase de armazenamento (PERRONE et al., 2007), como podridões em figo, milho e cebola (FREIRE et al., 2006; MARQUES et al., 2009; NUNES et al., 1997). Além de causar doenças em várias plantas, como a podridão do colo, na cultura do amendoim (MORAES et al., 1997 citado por ABREU, 2010) e a podridão vermelha do caule do sisal (LIMA et al., 1998).

Coutinho et al. (2006) e Soares et al. (2006) identificaram com base em características morfológicas o fungo *Aspergillus niger* como o agente causal da podridão vermelha do caule do sisal nos estados da Paraíba e Bahia, tendo sua patogenicidade confirmada (COUTINHO et al., 2006). No entanto, sabe-se que existem diversas espécies de *Aspergillus* semelhantes (*Aspergillus* agregado niger) e algumas são indistinguíveis por caracteres morfológicos (GIRAUD et al., 2007). Em 2011, Santos identificou mais duas espécies de *Aspergillus* patogênicas ao sisal: *A. tubingensis* e *A. brasiliensis*. No entanto, sua significância no campo parece ser limitada.

Interação planta-patógeno

A maioria das interações entre plantas e microrganismos é benéfica para ambos. Na natureza, a doença é uma exceção, já que plantas são resistentes à maioria dos fitopatógenos existentes. Estima-se que apenas 10% das espécies fúngicas causam doença em plantas (KAHMANN e BASSE, 2001).

A interação de microrganismos patogênicos com plantas hospedeiras se dá por meio de uma série de eventos sucessivos e ordenados, denominados ciclo das relações patógeno-hospedeiro. Este ciclo é caracterizado pelos processos de sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução do patógeno (AMORIN, 1995). Durante cada processo, tanto a planta quanto o patógeno regulam a expressão de genes.

Além do patógeno e do hospedeiro é necessário que um conjunto de condições ambientais seja favorável, para a doença se desenvolver. O ambiente pode afetar tanto o crescimento e a resistência da planta hospedeira, bem como a taxa de crescimento, virulência do organismo patogênico e a sua dispersão (AGRIOS, 2005). As interações dos três componentes da doença têm sido mostradas como um triângulo, denominado "triângulo da doença".

O ciclo da doença envolve alterações na planta, bem como no patógeno. O contato inicial de um agente patogênico com a planta é mediado por propágulos do patógeno, denominado inóculo, o qual permite o início da infecção. Gaumann (1950) definiu infecção como o processo que se inicia com a germinação do esporo até o estabelecimento das relações parasitárias com o hospedeiro. Portanto, o processo de infecção engloba os eventos de pré-penetração, penetração e estabelecimento de relações parasitárias entre o patógeno e o hospedeiro.

Os eventos de pré-penetração englobam o contato inicial, onde o inóculo é anexado à superfície do hospedeiro. A forma como os esporos aderem à superfície das plantas parece envolver a atividade de inúmeras enzimas hidrolíticas (AGRIOS, 2005). Com o inóculo anexado, o patógeno pode penetrar no tecido do hospedeiro por três vias distintas: penetração direta, por meio de aberturas naturais ou ferimentos. Patógenos que utilizam a via de penetração direta necessitam vencer as barreiras naturais do tecido vegetal, como a cutícula. As aberturas naturais das plantas, como estômatos e

hidatódios representam outras vias de penetração no hospedeiro. Por outro lado, penetração por ferimentos é favorecida, na maioria das vezes, por práticas agrícolas como a poda e a desbrota (AMORIM, 1995).

Os patógenos podem ser classificados por meio das relações nutricionais patógeno-hospedeiro em três grupos: biotróficos, hemibiotróficos e necrotróficos. Os fungos biotróficos extraem nutrientes das células vivas do hospedeiro sem causar a morte celular imediata. Em contraste, os necrotróficos causam a morte dos tecidos desde o início da infecção e posteriormente nutrem-se do tecido morto. Os hemibiotróficos, por sua vez, caracterizam-se por uma fase biotrófica inicial e uma fase necrotrófica posterior (AMORIM, 1995).

Aspergillus niger é um fungo necrotrófico. Assim como todos os necrotróficos, produzem inúmeras enzimas hidrolíticas e toxinas, os quais causam a morte celular, nutrindo-se do tecido morto. A desestruturação da parede celular, provocada pela ação das enzimas, ocasionam alterações na permeabilidade seletiva da membrana plasmática e, conseqüentemente, a morte celular (AMORIM, 1995).

Enzimas hidrolíticas

As enzimas produzidas pelos fungos tem papel importante no processo de infecção do hospedeiro. As enzimas hidrolíticas possuem a capacidade de destruir componentes da parede celular, processo importante na patogênese (GRIFFIN, 1994). Essa degradação enzimática permite aos fungos obter nutrientes da planta, bem como facilitar a penetração e colonização do tecido vegetal.

Dentre as principais enzimas relacionadas com a patogenicidade de fungos fitopatogênicos, podemos citar a celulase (HUBBALLI et al., 2011), protease (MOREIRA et al., 2005), cutinase (ROCHA et al., 2008) e lipase. A cutícula compreende toda a parte aérea da planta. Esta camada protege a planta contra a perda d'água (ALQUINI et al., 2003) e constitui o primeiro obstáculo físico à entrada de patógenos. Os fungos fitopatogênicos produzem cutinases e lipases, que catalisam a hidrólise de ligações éster a partir de polímeros de ácidos graxos, o que facilita a penetração de fungos por meio da

cutícula (HYNES et al., 2006). Por outro lado, proteases clivam as ligações amida entre os grupos carboxila e amina dos aminoácidos.

Em 1995, Pascholati defende o papel essencial que a celulase desempenha na patogenicidade dos fungos por degradar as microfibrilas de celulose. Esta degradação contribui para o enfraquecimento da parede celular, uma vez que as microfibrilas proporcionam suporte aos outros componentes da parede celular vegetal.

Ocratoxina A

A ocratoxina A (OTA) foi descoberta em 1965 como um metabólito de *Aspergillus ochraceus* (VAN DER MERWE et al., 1965). É uma micotoxina produzida por alguns fungos filamentosos, como *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. (DALL'ASTA et al., 2004). No entanto, nem todos os isolados de uma espécie possuem esta capacidade. As micotoxinas são produtos do metabolismo secundário desses fungos (VARGAS et al., 2003).

As micotoxinas podem ser encontradas em vários produtos agrícolas, como cereais, milho e frutas secas. Contudo, por serem capazes de se acumular ao longo da cadeia alimentar, podem ser encontradas em produtos pecuários, como o leite, ovos e carne de animais (ABRUNHOSA, 2008).

A exposição humana às micotoxinas pelo consumo de alimentos é uma questão de saúde pública em todo o mundo (BRERA et al., 1998). A contaminação dos alimentos pode ocorrer no campo, durante e após a colheita, transporte, processamento e armazenamento do produto (PERRONE, 2007). O desenvolvimento de fungos não implica na presença de micotoxinas. Por outro lado, a ausência de sinais dos fungos não significa que o alimento encontra-se livre de toxinas, já que elas podem permanecer no produto mesmo depois do desaparecimento dos fungos responsáveis por sua produção (SABINO, 1996).

A biossíntese da OTA (Figura 4a) ainda não foi totalmente elucidada. Sabe-se, no entanto, que os genes responsáveis por codificar uma policetídeo sintetase (PKS) estão envolvidos (GALLO et al., 2009). O grupo das ocratoxinas caracteriza-se por possuir uma estrutura molecular que consiste basicamente de uma β -fenilalanina ligada a uma isocumarina, mediante uma

ligação amida. A isocumarina é conhecida como ocratoxina α (Figura 4b), considerada menos tóxica do que a OTA (ABRUNHOSA et al., 2006).

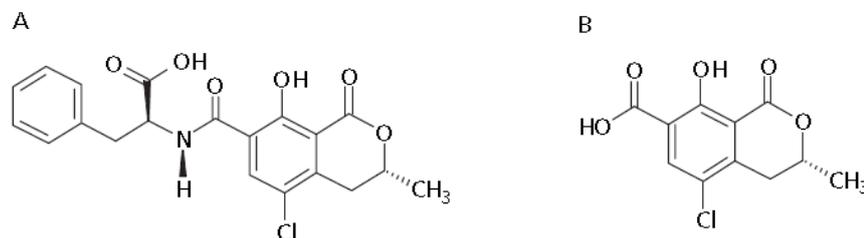


Figura 4: Estrutura molecular de ocratoxinas. Ocratoxina A (a); Ocratoxina α (b).

A OTA é uma micotoxina com propriedades nefrotóxica, imunossupressora, teratogênica, citotóxica, neurotóxica e carcinogênica (ABARCA et al., 2004). Ela ainda pode induzir mutações gênicas através de mecanismos genotóxicos ainda não muito claros (RINALDI et al., 2007).

A nefrotoxicidade é o maior efeito tóxico de OTA (KHOURY e ATOUI, 2010). Esta micotoxina afeta tanto a saúde animal quanto a humana. É responsável pela ocorrência de tumores no trato urinário e pela Nefropatia Endêmica nos Balkans, síndrome caracterizada por apresentar disfunção renal crônica e degenerativa (LOPES et al., 2002).

A atividade imunossupressora da OTA é caracterizada pela redução do tamanho de órgãos vitais do sistema imune, tais como timo, baço e nódulos linfáticos. Há alterações no número e funções de células do sistema imune. A atividade imunotóxica provavelmente resulta em mudanças degenerativas e morte celular por necrose e apoptose. Além disso, a reposição das células afetadas ocorrerá de forma lenta, devido à inibição da síntese das proteínas (AL-ANATI e PETZINGER, 2006).

O potencial teratogênico de OTA depende da quantidade ingerida durante o período da gestação (KHOURY e ATOUI, 2010). Os efeitos citotóxicos da OTA estão baseados na inibição e/ou ativação de enzimas, várias das quais utilizam a fenilalanina como um substrato, pois a OTA é um análogo deste aminoácido (AL-ANATI e PETZINGER, 2006). Os mecanismos moleculares da neurotoxicidade da OTA ainda não estão bem elucidados, mas

sabe-se que contribui para o surgimento de doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer (ZHANG et al., 2009).

Classificada pela Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer como um agente cancerígeno para os seres humanos (Grupo 2B). É considerado um composto tóxico acumulativo de fácil absorção e lenta eliminação. Os elevados tempos médios de vida da OTA devem-se ao fato de esta possuir grande afinidade pela albumina, proteína do plasma sanguíneo, o que dificulta sua excreção.

A estrutura molecular de OTA é altamente estável, resistente à acidificação e altas temperaturas. Esta molécula pode resistir três horas de esterilização a 121 °C (TRIVEDI et al., 1992). Essas características dificultam a remoção total da molécula nos produtos alimentares contaminados (KHOURY e ATOUI, 2010).

Embora seja uma das causas de doença em humanos, não há relatos na literatura do envolvimento de OTA na patogenicidade de fungos as plantas. Sabe-se que fungos necrotróficos, como *A. niger*, podem produzir toxinas, que os auxiliam durante o processo de colonização ao tecido vegetal (AMORIM, 1995). No entanto, ainda não se tem conhecimento, se a produção de OTA esta relacionada com a patogenicidade deste fitopatógeno as plantas de sisal.

CAPÍTULO 1

Expressão de enzimas hidrolíticas e ocratoxina A em uma simulação *in vitro* da interação entre *Aspergillus niger* e sisal

RESUMO

Jesus, E. S. Expressão de genes de enzimas hidrolíticas e ocratoxina A de *Aspergillus niger* *in vitro*

O objetivo do trabalho foi estudar por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR), o envolvimento dos genes que codificam a micotoxina ocratoxina A e algumas enzimas hidrolíticas em condições simuladas *in vitro* da interação entre *Aspergillus niger* e sisal. Dois meios de cultivo foram utilizados, um meio mínimo (MM) e outro meio suplementado com extrato de sisal (MS). *Primers* para celulase, cutinase, lipase, protease, ocratoxina A, fator de alongação 1- α (EF), α -tubulina e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, sendo os três últimos utilizados como controle endógeno, foram desenhados e otimizados para amplificação por qPCR. De modo geral, os genes alvo apresentaram maior expressão no meio MS, quando comparado com MM. Os genes que codificam a cutinase, protease e celulase alcançaram uma maior expressão e assim a mantiveram após 48 h, enquanto que ocratoxina A apresentou uma maior expressão após 66-72 h. Os resultados obtidos representam as primeiras informações sobre os genes de *A. niger* potencialmente envolvidos na patogenicidade ao sisal.

Palavra-chave: *Agave sisalana*, PCR em tempo real e patossistema.

ABSTRACT

Jesus, E. S. Expression of genes coding for hydrolytic enzymes and ochratoxin A in an *in vitro* simulation of the interaction between sisal and *Aspergillus niger*

The objective of this study was to investigate the involvement of hydrolytic enzymes and ochratoxin A in an *in vitro* simulation of the interaction between *Aspergillus niger* and sisal by using quantitative real time PCR (qPCR). A minimum medium (MM) and the MM medium supplemented with sisal extract (MS) were used. Primers for cutinase lipase, protease, ochratoxin A and elongation factor 1- α (EF), α -tubulin and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with this last one used as endogenous control were designed and optimized for qPCR. In general, all target genes showed higher expression in MS than in MM medium. Cutinase, protease and cellulase genes reached and kept higher expression levels after 48 h, while ochratoxin A showed higher expression after 66-72 h. These results represent the first data on genes putatively involved in the pathogenicity of *A. niger* to sisal.

Keywords: *Agave sisalana*, quantitative real time PCR, pathosystem.

INTRODUÇÃO

O fungo *Aspergillus niger* é uma das muitas espécies utilizadas na indústria de fermentação para a produção de enzimas hidrolíticas e ácidos orgânicos (VARGA et al. 2000). Esta espécie recebeu o *status* de GRAS (*generally regarded as safe*), conferido pela *Food and Drug Administration* (FDA). No entanto, devido à capacidade de alguns isolados em produzir ocratoxina A (OTA) (ABARCA et al., 1994), faz-se necessário verificar se os isolados utilizados na indústria são produtores desta micotoxina. Esses microorganismos contaminam vários produtos agrícolas, durante os estágios da pré-colheita, colheita, armazenamento e processamento (PERRONE et al., 2007).

Apesar da importância industrial, *A. niger* pode provocar a deterioração de alimentos, além de causar doenças em várias plantas. A cultura do sisal, por exemplo, encontra-se em declínio devido à podridão vermelha do caule, doença ocasionada por *A. niger* (COUTINHO et al., 2006; SOARES et al., 2006).

A podridão vermelha do caule do sisal tem ocasionado perdas consideráveis à cultura de sisal. As plantas doentes tornam-se impróprias ao desfibramento e morrem com o progresso da doença (COUTINHO et al., 2006).

O sisal é cultivado em grande escala no Brasil, que é responsável por mais de 60% da produção mundial. No Brasil a produção de sisal concentra-se na região nordeste, onde a Bahia é o maior produtor. Milhares de famílias do semi-árido nordestino obtêm sua renda a partir da produção de sisal no campo, beneficiamento nas fábricas e a comercialização de seus produtos (SUINAGA et al., 2006).

O processo de penetração e colonização de *A. niger* em plantas de sisal ainda não foi estudado. No entanto, sabe-se que fitopatógenos necrotróficos, em geral, dependem da produção de enzimas hidrolíticas para penetrar, toxinas e hormônios para crescer no interior do hospedeiro (PASCHOLATI, 1995; AGRIOS, 2005).

No presente trabalho, foi realizado o desenho e a otimização de *primers* para a quantificação da expressão de genes responsáveis pela síntese de lipases, proteases, cutinases, celulases e a ocratoxina A em *A. niger* por meio

da técnica de PCR em tempo real. Os experimentos foram conduzidos de modo a simular a interação *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

Meios de cultura

Foram utilizados dois meios de cultura diferentes, um meio mínimo (MM) composto por Sacarose (10g), NaNO₃ (2g), KH₂PO₄ (1g), MgSO₄ 7 H₂O (0,5g), KCl (0,5g) e 0,2 ml de uma solução estoque. E o mesmo meio suplementado com 1% de extrato de sisal (MS). Para preparar o meio suplementado com sisal, o caule de seis mudas foi triturado em liquidificador com água destilada. Em seguida, a solução foi peneirada e adicionada ao meio mínimo. Após a autoclavagem, os meios foram distribuídos em placa de Petri. O isolado de *A. niger* AN18 foi repicado nas placas. Este isolado foi obtido da região sisaleira do Estado da Bahia e é comprovadamente patogênico ao sisal.

Ensaio *in vitro*

Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado com três repetições para cada tratamento. Para análise da expressão gênica foram definidos sete tempos de coleta de micélio após a adição do inóculo do fungo aos meios de cultura: 36, 42, 48, 54, 60, 66 e 72 h. O micélio foi embalado em papel alumínio e devidamente identificado. O material foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em ultrafreezer -80 °C para posterior extração do RNA.

Extração, quantificação do RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

A extração do RNA total das amostras foi feita a partir de 75 mg de material vegetal, macerado com nitrogênio líquido, usando o *RNAqueous® Kit* (*Applied Biosystems, Ambion*) seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com *Ambion® TURBO DNA-free™ DNase Treatment and Removal Reagents* (*Applied Biosystems*) para remoção de

contaminantes de DNA e subsequente remoção de DNase. O RNA extraído foi quantificado utilizando o Qubit 2.0 Fluorometer.

O RNA foi convertido em cDNA, a partir da transcrição reversa (RT). Utilizou-se o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)* seguindo as recomendações do fabricante. O produto da reação final de 20 µL foi estocado a -20°C.

Desenho e otimização dos primers

O programa ClustalW (<http://align.genome.jp/>) foi utilizado para alinhar as sequências referentes a cada gene. Em seguida, a região mais conservada foi selecionada para o desenho dos iniciadores. Os *primers* foram construídos empregando o programa on-line *Primer3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), ajustado com os parâmetros padrões, exceto: o tamanho do fragmento a ser amplificado, variando de 80 a 250 pb; tamanho do *primer* entre 19 e 21 pb; temperatura de anelamento entre 59 e 61°C; conteúdo GC% entre 40 e 60%.

Os números de acesso dos isolados utilizados para o desenho dos *primers* foram os seguintes: ocratoxina A (XM 001397276.2), protease (XM 001396377.2), celulase (XM 001389970.2), cutinase (XM 001399174.1), lipase (XM 001397840.2) α-tubulina (XM 003188558.1), fator de alongação 1-α (XM 001398394.2) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (XM 001397459.2).

Os *primers* foram otimizados por meio da PCR convencional. Foi utilizado o DNA genômico do isolado fúngico. As condições de termociclagem foram: 94°C por 2 minutos, seguido de nove ciclos de desnaturação a 94°C por 45 s, 60°C por 45 s, 72°C por 1 minuto e 29 ciclos de 94°C por 30 s, 48°C por 30 s, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 10 min. Para cada reação foram utilizados 5,0 µL de tampão 10X (10mM de Tris e 50mM de KCl), 2 µL de MgCl₂ (50mM), 2 µL de dNTPs (4x2,5mM), 0,3 µL de Taq-Polimerase (5 U/µL), 0,75 µL de oligonucleotídeos *forward* e *reverse* (10 mM) e 2 µL de DNA genômico, completando com água livre de nucleases para um volume final de 25 µL.

PCR em Tempo Real

As reações de PCR em tempo real foram conduzidas em equipamento ABI PRISM® 7500 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems). A amplificação dos genes alvo foi realizada a partir do cDNA total, utilizando a metodologia SYBR Green, o qual tem a capacidade de intercalar fitas duplas de DNA, emitindo fluorescência durante a ligação. Como referência endógena foi utilizado o gene Fator de Elongação 1 alfa. Uma diluição seriada (1, 1:5, 1:50, 1:500 e 1:5000) do cDNA foi utilizada para calcular a eficiência de cada *primer*. Cada diluição para o ponto da curva padrão foi realizado em triplicata.

As reações de amplificação foram realizadas no volume final de 25 µL, contendo 12.5 µL do *Power SYBR® Green Master Mix*, o qual contem: SYBR® Green I Dye, AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, dNTPs, Referência Passiva (ROX) e tampão otimizado dos componentes; 0.75 µL de cada *primer* (10 µM); 2 µL de amostra do cDNA estoque e 9.0 µL de H₂O livre de nucleases. Reações como controle negativo foram realizadas utilizando H₂O livre de nucleases como amostra. As amplificações foram conduzidas em incubações de 95 °C por 2 min, seguidas de 40 ciclos de 94 °C por 45 s, 60 °C por 45 s e 72 °C por 1 min, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. Por fim a curva de *Melting* foi realizada para todas as amostras.

A quantificação relativa foi utilizada para determinar a expressão dos genes alvo, por meio do método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

A análise estatística da expressão dos genes em diferentes tempos foi realizada por meio da comparação das médias usando o teste de Tukey e comparação entre os meios de cultura nos mesmos tempos usando o teste *t* no SISVAR. Em todos os casos a significância foi avaliada a $P < 0.05$.

RESULTADOS

Desenho e otimização de primers

Foram desenhados 21 pares de *primers* para os genes alvo ocratoxina A, celulase, cutinase, protease e lipase (cinco, três, três, cinco e cinco respectivamente). Além de três pares de *primers* para os controles endógenos.

Os genes utilizados como endógeno foram α -tubulina (Tuba), fator de alongação 1- α (EF) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (gli). Todos os *primers*, exceto *ocra3* e *ocra5*, foram otimizados com uma temperatura de anelamento de 60 °C em PCR convencional.

Dentre os *primers* desenhados, foram escolhidos de forma aleatória cinco *primers* para serem utilizados no PCR em tempo real (*ocra4*, *cel1*, *cut1*, *pro3* e *lip4*).

PCR em Tempo real

A curva padrão foi obtida após a amplificação de uma diluição seriada de cDNA das amostras. Esta curva permite analisar a eficiência da PCR para um conjunto específico de *primers*. A eficiência da PCR para cada par de *primer* utilizado variou de 81% do primer *gli* a 116% referente ao gene da protease (Tabela 1). O *primer* escolhido para ser usado como controle endógeno foi o EF, devido à eficiência da PCR ser mais próxima de 100%.

Tabela 1. Características dos *primers* selecionados para as reações de PCR em tempo real.

Gene	Sequência dos <i>primers</i> *	Amplicon ^{aa}	Função da Calibração ($y = mx+b$) ^{aaa}	Coefficiente de Correlação (R^2) ^{aaaa}	Eficiência da PCR (%) ^a
Ocra4	F: ATGCGCAGTGTCCGACATGATTTG R: TCAAGAACCATGGATGCCTGGAGA	123	$Y = -3.121x + 25.441$	0.997	109
Pro3	F: TCCGGAAGTTGTGACATGGAGTGA R: AGCTGAGGAAACCCGTAAGTGGT	81	$Y = -2.985x + 33.457$	0.992	116
Cel1	F: AATGGTTGCCTAGTGTGCATGCTG R: TTGATCGCCATCCAGACCACGTAT	132	$Y = -3.213x + 26.756$	0.999	104
Cut4	F: AGCAGCAAGGTGAAGGAGTTCTGT R: CACTGCCATAAGTCAAATGCGCCA	88	$Y = -3.229x + 28.278$	0.999	104
Tuba	F: TGGAAGGGAGTTTACGGTTG R: ACTCACAACCCTCCCATCAG	201	$Y = -3.4x + 38.588$	0.898	96
EF	F: AAGATGGCCAAGCTCTACGA R: CTGTGGACAGGTGGATGTTG	203	$Y = -3.247x + 24.651$	0.998	103
Gli	F: CGAGTCCACTGGTGTCTTCA R: CAAGAAGCGTTGGAGAGGAC	168	$Y = -3.877x + 21.757$	0.996	81

* Sequência do *primer forward* (F) e *reverse* (R).

^a Eficiência da PCR = $[(10/(1/s)) - 1] * 100$, onde S é o *slope* (ângulo).

^{aa} Fragmento amplificado pelo *primer*.

^{aaa} $y = mx + b$, onde b = y- intercepta a linha da curva padrão e m = ângulo da linha da curva padrão.

^{aaaa} R^2 deve apresentar valores mais próximo possível de 1 (100%).

Os *primers* desenhados para lipase, apesar de terem sido otimizados em PCR convencional, não apresentaram eficiência em qPCR, o que impossibilitou o estudo da expressão para o gene da lipase.

Em relação à expressão dos demais genes alvo, o estudo mostrou que todas as enzimas apresentaram maior expressão no MS, exceto a celulase no tempo 48 h. As enzimas apresentaram uma maior expressão a partir do tempo de 48 h e geralmente mantiveram um nível mediano de expressão a partir desse tempo. Já a ocratoxina A apresentou uma maior expressão após 66-72 h.

O estudo da expressão da celulase no MM apresentou um pico de expressão no tempo 48 h de 17,6X mais que o calibrador (36 h). Já no MS, a expressão foi menor nesse período, tendo um pico de expressão em 54 h, 8,1X mais que o calibrador (Figura 1a).

O gene da cutinase apresentou a menor taxa de expressão comparado com os demais genes, tanto no MM quanto no MS (Figura 1b). Assim como ocorreu na celulase, a maior taxa de expressão no MM foi em 48 h, 2,8X mais que o calibrador. Já no MS, a taxa de expressão foi superior em todos os tempos, com um pico 5,4X mais que o calibrador em 48 h.

A protease foi mais expressa no MS (Figura 1c). A partir de 48 h houve um aumento, tendo um pico de expressão às 54 h de aproximadamente 27X mais que o calibrador. Já no MM a taxa de expressão foi mínima, com um aumento no tempo de 48 e 60 h (2,7X e 2,5X respectivamente). No entanto, esse aumento ainda é menor do que a expressão no meio MS.

Aspergillus niger apresentou uma maior expressão da ocratoxina A no MS (Figura 1d), com um pico de expressão no último tempo, de aproximadamente 34X mais que o calibrador. No entanto, nos tempos anteriores a taxa de expressão foi baixa, mantendo-se praticamente constante até às 66 horas. Por outro lado, no MM, *A. niger* exibiu uma taxa de expressão quase constante, exceto no tempo 66 (19,6X mais).

Em resumo, observa-se uma maior expressão das enzimas no meio suplementado, exceto para celulase no tempo 48 h. Por outro lado, a ocratoxina A apresentou uma baixa expressão nos tempos iniciais, tendo um pico de expressão no último tempo do MS (72 h).

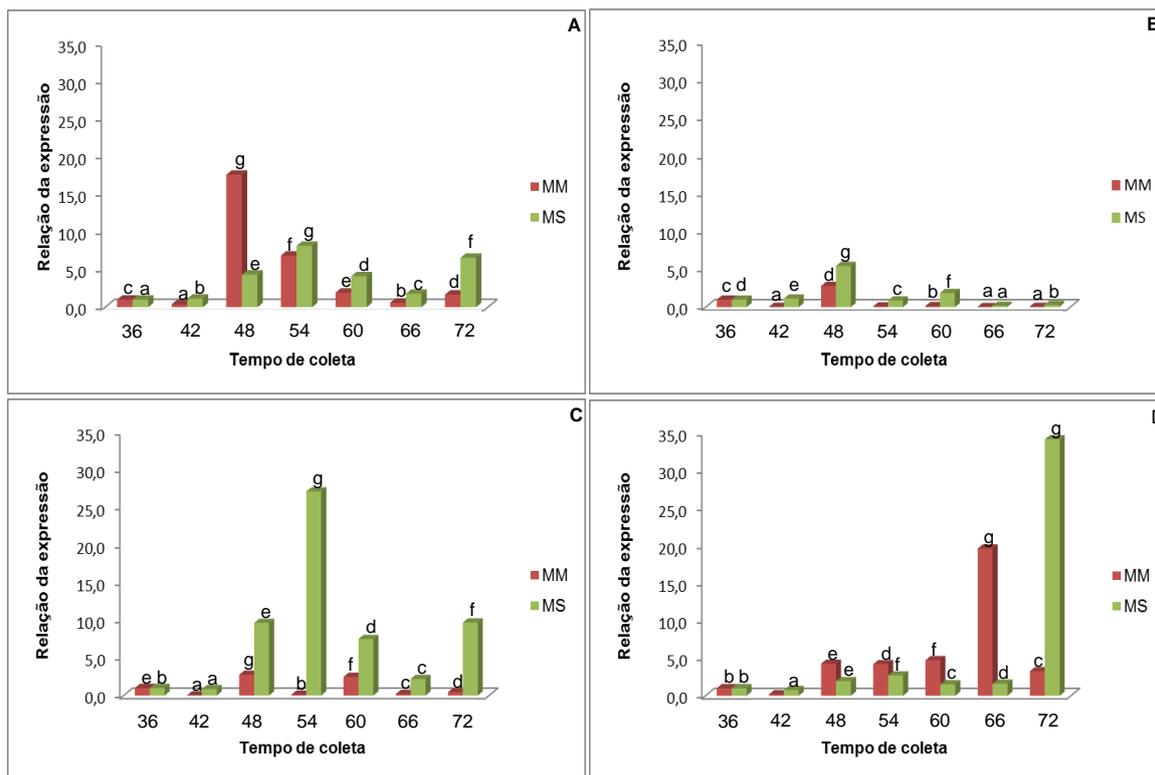


Figura 1. Análise da expressão dos genes alvo no meio mínimo e no meio suplementado com sisal. Genes da celulase (A), cutinase (B), protease (C) e ocratoxina A (D). Médias com letras minúsculas representam a comparação da expressão nos diferentes tempos de amostragem.

A comparação de cada gene entre os diferentes meios de cultura por meio do teste *t* apresentou diferenças significativas para todos os tempos de amostragem.

DISCUSSÃO

Os *primers* desenhados neste trabalho, além de permitir o estudo *in vitro*, possibilitarão analisar o papel dos genes responsáveis pela síntese de proteases, cutinases, celulases e a ocratoxina A durante os eventos de penetração e colonização de sisal por *A. niger*.

Neste estudo, análises em PCR em tempo real revelaram que tanto as enzimas hidrolíticas quanto a micotoxina OTA foram expressas em algum momento do crescimento fúngico tanto no meio de cultivo mínimo quanto no suplementado com extrato de sisal. No entanto, a OTA e todas as enzimas

estudadas, exceto a celulase no tempo 48 h, apresentaram uma maior taxa de expressão no meio suplementado. Estudos *in vivo* (BLUHM et al., 2008; KARLSSON et al., 2007) mostram outras espécies de fungos, como *Cercospora zea-maydis* e *Heterobasidion parviporum*, que expressam enzimas e micotoxina durante o processo de patogênese as plantas de milho e *Picea abies* respectivamente.

De modo geral, a expressão do gene da celulase pelo fungo *A. niger* foi maior no MS do que no MM, exceto no tempo de 48 h (Figura 1a). Estudos similares (Hubballi et al., 2011 e Karlsson et al., 2007), demonstraram o possível papel da celulase na patogenicidade de alguns fungos. Hubballi et al. (2011) mostraram a produção de celulase *in vitro* por *Alternaria alternata*, patógeno foliar de *Morinda citrifolia*, sugerindo que a produção de celulase pelo fitopatógeno parece facilitar a dissolução da parede celular vegetal, o que permite o processo de penetração do patógeno no hospedeiro e desintegração do tecido vegetal. Assim, a produção de celulase possivelmente desempenha um papel vital na patogenicidade de *A. alternata*. O estudo de Karlsson et al. (2007) com o fitopatógeno *Heterobasidion parviporum*, mostrou que genes da celulase foram expressos durante a colonização as plantas de Norway spruce. Assim, pode ser inferido que a enzima celulase possivelmente esteja relacionada com a patogenicidade de muitos fungos patogênicos a plantas.

A. niger expressa 2,6X mais cutinase quando crescido em meio contendo extrato de sisal. Esta enzima é responsável pela degradação de cutina, polímero estrutural da cutícula da planta. No entanto, o papel de cutinases na patogenicidade de fungos é bastante controverso. Estudos envolvendo inativação de genes têm avaliado o papel de cutinases na patogenicidade e virulência de fungos. Alguns autores enfatizam o papel essencial da cutinase na patogenicidade e virulência de fungos fitopatogênicos, como *Fusarium solani f. sp. pisi* (LI et al., 2002; ROGERS et al., 1994) e *Botrytis cinerea* (COMMÈNIL et al., 1998). Outros trabalhos mostram que genes da cutinase não são essenciais para a patogenicidade ou redução da virulência de *Botrytis cinerea* (REIS et al., 2005) e *Fusarium oxysporum* (ROCHA et al., 2008).

As proteases são enzimas responsáveis pela clivagem proteolítica de peptídeos, fornecendo nitrogênio para os fungos durante o processo de infecção. Essas enzimas provavelmente desempenham importante papel na patogênese (MOREIRA et al., 2005). O presente estudo mostra uma taxa de expressão do gene da protease superior no MS em todos os tempos de coleta das amostras (Figura 1c). O aumento da expressão da protease por *A. niger* crescido na presença do extrato de sisal, mostra a importância desta enzima no processo de patogenicidade. Dados semelhantes foram obtidos por outros trabalhos sobre o papel essencial da protease na patogenicidade de *Sclerotinia sclerotiorum* a plantas de girassol (POUSSEREAU et al., 2001) e *Botrytis cinerea* em frutos de maçã (ROLLAND et al., 2009).

A ocratoxina A, uma micotoxina produzida por alguns fungos filamentosos nunca foi relatada como fator de patogenicidade em fungos. Talvez, jamais tenha sido estudada sob esse aspecto. Neste trabalho, observa-se pouca expressão da ocratoxina A, exceto no tempo de 66 e 72 h no meio MM e MS respectivamente.

O estudo mostrou que a cutinase é a primeira enzima a ser expressa por *A. niger*, seguida pela protease e celulase. Já a ocratoxina A apresentou maior expressão nos últimos tempos. Neste caso, percebe-se que *A. niger* expressa esta micotoxina depois da expressão de todas as enzimas hidrolíticas. No entanto, não existem evidências que comprovem o envolvimento da ocratoxina A na patogenicidade de *A. niger* a plantas de sisal. O que existem são especulações a respeito do papel da ocratoxina A na interação *A. niger* e sisal.

CAPÍTULO 2

Interação *Aspergillus niger* x sisal: tentativas de estudo da expressão de genes potencialmente envolvidos na patogenicidade e na defesa das plantas contra o fungo

RESUMO

Jesus, E. S. Interação *Aspergillus niger* x sisal: tentativas de estudo da expressão de genes potencialmente envolvidos na patogenicidade e na defesa das plantas contra o fungo

Poucas informações existem sobre o patossistema sisal x *Aspergillus niger*. O objetivo desse trabalho foi estudar o papel dos genes que codificam a micotoxina ocratoxina A e algumas enzimas hidrolíticas no processo de interação com plantas de sisal. Quatro outros *primers*, originalmente descritos para plantas de banana, foram otimizados para sisal e utilizados como potencialmente envolvidos no processo de defesa das plantas contra *A. niger*. As análises da expressão gênica foram realizadas por PCR em Tempo Real, utilizando a metodologia SYBR Green. Tanto os genes potencialmente envolvidos na patogenicidade de *A. niger* quanto os envolvidos na defesa de plantas contra *A. niger* não puderam ser estudados. Enquanto os genes de patogenicidade não foram amplificados por falta de RNA nas amostras, os genes de defesa não puderam ser amplificados por falta de especificidade. Estudos posteriores serão realizados a fim de otimizar a metodologia utilizada para a extração de RNA da interação.

Palavras-chave: Fungo, Patogenicidade, *Agave sisalana*, Defesa e PCR quantitativo.

ABSTRACT

Jesus, E. S. Interaction *Aspergillus niger* x sisal: attempts at studying the expression of genes putatively involved in pathogenicity and plant defense

Little is known about the pathosystem sisal x *Aspergillus niger*. The objective of this study is to investigate the role of genes that code for the mycotoxin ochratoxin A and some hydrolytic enzymes in the interaction between sisal and *A. niger*. Four other primers, originally described for banana, were optimized for sisal and used as putatively involved in the defense of sisal against *A. niger*. The analyses of gene expression were done with quantitative PCR utilizing the SYBR Green methodology. It was not possible to study the genes putatively involved in the pathogenicity of *A. niger* and the ones potentially involved in plant defense against the fungus for different reasons. While the genes involved in pathogenicity were not amplified due to the lack of fungal RNA in the samples, the defense genes could not be amplified for lack of specificity. Further studies will be conducted to optimize the methodology utilized to extract the RNA from the interaction.

Keywords: Fungus, pathogenicity, *Agave sisalana*, defense genes, and quantitative PCR.

INTRODUÇÃO

O sisal (*Agave sisalana*) é uma monocotiledônea cultivada em grande escala no Brasil, maior produtor mundial. No Brasil, há um destaque para o estado da Bahia, que corresponde por aproximadamente 94% da produção nacional. As características morfológicas do sisal, como folhas carnosas, número reduzido de estômatos e epiderme fortemente cutinizada permitem o cultivo desta planta em áreas climáticas pouco favoráveis a exploração de outras culturas (SILVA et al., 2008).

O principal produto da cultura sisaleira é a fibra tipo dura, a qual oferece inúmeras aplicações. Esta fibra pode ser utilizada para produzir artesanatos, como vassouras, bolsas, chapéus, sandálias e tapetes, na indústria automotiva e de móveis (ALVES e SANTIAGO, 2005). Além da fibra, o sisal oferece a mucilagem que pode ser utilizada como complemento alimentar para rebanhos bovinos e caprinos.

Apesar das características morfológicas, as quais podem conferir uma barreira natural à penetração de microrganismos patogênicos, o sisal tem sido afetado pela podridão vermelha do caule do sisal (LIMA et al., 1998; COUTINHO et al., 2006). Esta doença tem ocasionado perdas consideráveis na produção de sisal, pois resulta na morte da planta e perda da qualidade da fibra. A podridão vermelha do caule do sisal é causada pelo fungo *Aspergillus niger*. Esse fungo é classificado como necrotrófico, devido à produção de inúmeras enzimas hidrolíticas e toxinas, os quais causam a morte do tecido vegetal desde o início da infecção.

Apesar do caráter patogênico, *A. niger* possui grande importância industrial devido à capacidade de produzir enzimas e ácidos orgânicos para o consumo humano (VARGA et al., 2000). Esses fungos produzem micotoxinas, como ocratoxina A (OTA), uma potente nefrotoxina, carcinogênica a humanos, em baixas quantidades (ABARCA et al., 1994).

Não existem informações na literatura sobre os mecanismos de patogenicidade de *A. niger* em sisal.

O objetivo desse trabalho foi estudar a expressão de genes que codificam a micotoxina ocratoxina A e algumas enzimas hidrolíticas, como lipases, cutinases, celulasas e proteases em *A. niger* no processo de

patogênese e genes de defesa de plantas de sisal contra fitopatógenos por meio da técnica de PCR em tempo real.

MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio *in vivo*

Bulbilhos coletados no município de Santa Inês – BA foram plantados em sacos de polietileno com 0,5 kg de solo esterilizado e mantidos em casa-de-vegetação.

O isolado de *A. niger* AN18 crescido em meio BDA (Batata-dextrose-ágar) por 10 dias a 25 °C foi utilizado para a obtenção de uma suspensão fúngica de 10^7 conídios/ml (SÁ, 2009). A suspensão fúngica foi obtida pela raspagem em placa de Petri dos esporos do fungo e posterior contagem em câmara de Neubauer.

As plantas foram inoculadas após três meses do transplântio. Assim, o solo foi removido cuidadosamente e as raízes lavadas em água corrente, para retirada do excesso de solo. Em seguida, ferimentos foram realizados no caule das mudas por meio de agulhas de seringa esterilizadas. A inoculação foi realizada por imersão das mudas na suspensão de esporos durante cinco min (SÁ, 2009). Posteriormente, as mudas foram transferidas para os mesmos sacos de polietileno. O mesmo procedimento foi realizado para as plantas usadas como testemunhas, porém utilizou-se água destilada esterilizada (Figura 1).



Figura 1: Esquema metodológico para inoculação das plantas com o fungo.

Para análise da expressão gênica do fungo inoculado nas plantas de sisal, foram definidos 10 tempos de coleta do material após a inoculação: 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168, prevendo cobrir as fases de pré-penetração, penetração e colonização do fungo.

Alternativamente, *A. niger* foi inoculado também em discos do caule de sisal. Os discos foram desinfestados com álcool 70 % e NaOCl 1%. Cada disco foi inoculado com uma alíquota de 0,2 ml da suspensão fúngica 10^7 conídios/ml de *A. niger*. O mesmo procedimento foi realizado para os discos usados como testemunhas com água destilada esterilizada. Foram estabelecidos nove tempos de coleta: 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas. O material foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em ultrafreezer -80 °C para posterior extração do RNA.

Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado com três repetições para cada tratamento.

PCR em Tempo Real

A extração, quantificação do RNA e síntese de DNA complementar (cDNA) foram realizadas como descrito no primeiro capítulo deste trabalho.

Foram utilizados os mesmos *primers* desenhados no primeiro capítulo referente aos possíveis genes de patogenicidade de *A. niger* ao sisal.

Foram realizados também estudos com quatro genes de defesa de bananeira (catalases, *pr3* (endoquitinase), pectin acetylesterase (PAE) e peroxidase (POX). As sequências dos *primers* de defesa foram descritas por Van den Berg et al. (2007) e Forsyth (2006) e foram desenhados para amplificar genes responsáveis por codificar proteínas que estão potencialmente relacionadas à defesa de bananeira quando atacada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Sequências para sisal não estão disponíveis e como a bananeira também é monocotiledônea uma tentativa de amplificar os genes de defesa foi efetuada.

Utilizou-se amostras de cDNA de plantas ou discos de sisal inoculado com *A. niger*. As condições de termociclagem foram: 95 °C por 1 min, e 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, seguida de 59 °C por 30 s, para anelamento dos oligonucleotídeos e 72 °C por 30 s para a extensão dos

fragmentos. Para cada reação foram utilizados 5,0 μ L de tampão 10X (10mM de Tris e 50mM de KCl), 2 μ L de MgCl₂ (50mM), 2 μ L de dNTPs (4x2,5mM), 0,3 μ L de Taq-Polimerase (5 U/ μ L), 0,75 μ L de oligonucleotídeos *forward* e *reverse* (10 mM) e 2 μ L de cDNA, completando com água livre de nucleases para um volume final de 25 μ L.

As etapas da análise de expressão gênica foram realizadas como descrito para o primeiro capítulo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os *primers* desenhados para os genes que codificam as enzimas e a micotoxina potencialmente relacionadas com a patogenicidade de *A. niger* foram otimizados em PCR convencional a uma temperatura de anelamento de 60 °C. Já os *primers* de defesa referentes às enzimas catalase, *pr3*, PAE e POX foram otimizados a 63 °C. Apesar de terem sido otimizados em PCR convencional, os *primers* de defesa da planta não obtiveram uma eficiência adequada em PCR em tempo real. Isso pode ter ocorrido, devido ao tamanho dos *primers*, que provavelmente se anelaram a regiões do genoma de sisal não relacionadas com as sequências de genes de defesa. Ou pelo fato da análise do produto da PCR convencional ter sido feita em gel de agarose. Já que esse tipo de gel por não separar bem bandas de tamanhos pequenos, podem esconder bandas inespecíficas. Enquanto isso, na PCR em tempo real, devido à precisão e eficiência da técnica, bandas inespecíficas foram detectadas, produzindo uma curva de *Melting* totalmente inespecífica (Figura 2). Assim, não foi possível utilizar os *primers* de defesa para o estudo de expressão gênica por meio da técnica PCR em tempo real.

Em relação aos genes potencialmente envolvidos na patogenicidade de *A. niger* as plantas de sisal, o estudo da expressão gênica foi impossibilitado. Porém, desta vez a impossibilidade do estudo não estava ligada a curva que avalia a eficiência dos *primers*, mas sim a falta de material genético do fungo nas amostras utilizadas. As amplificações dos genes alvo ocorreram nos

últimos ciclos da PCR em tempo real, apresentando uma curva de *Melting* totalmente inespecífica (figura 3).

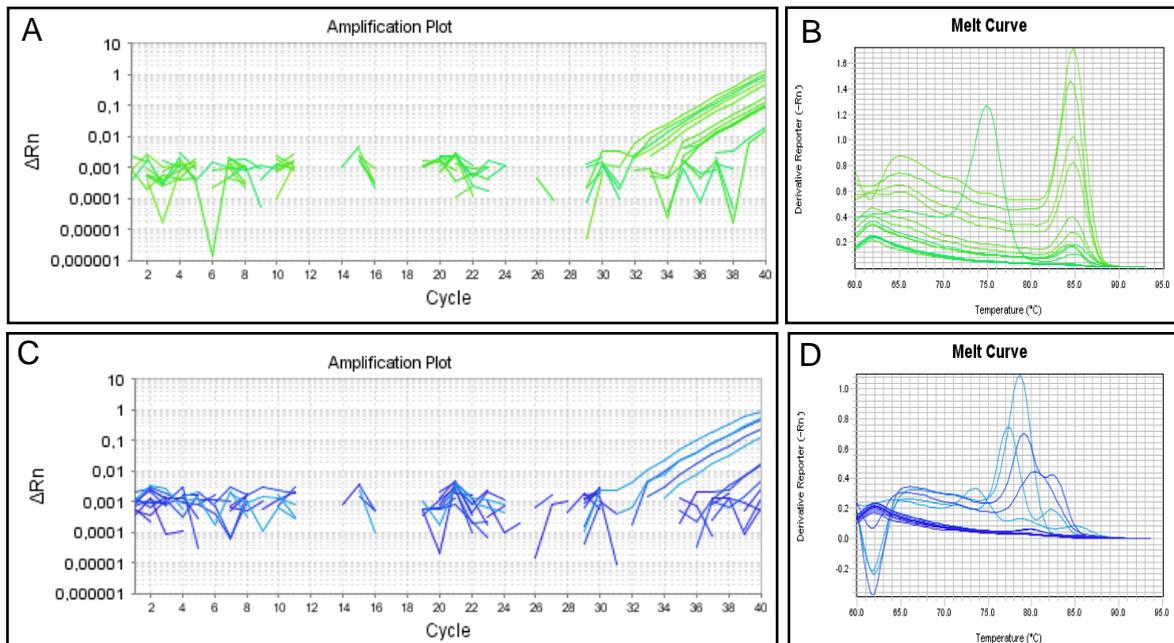


Figura 2. Amplificação e curva de *Melting* de genes de defesa de sisal. Gene da catalase (A-B) e peroxidase (C-D).

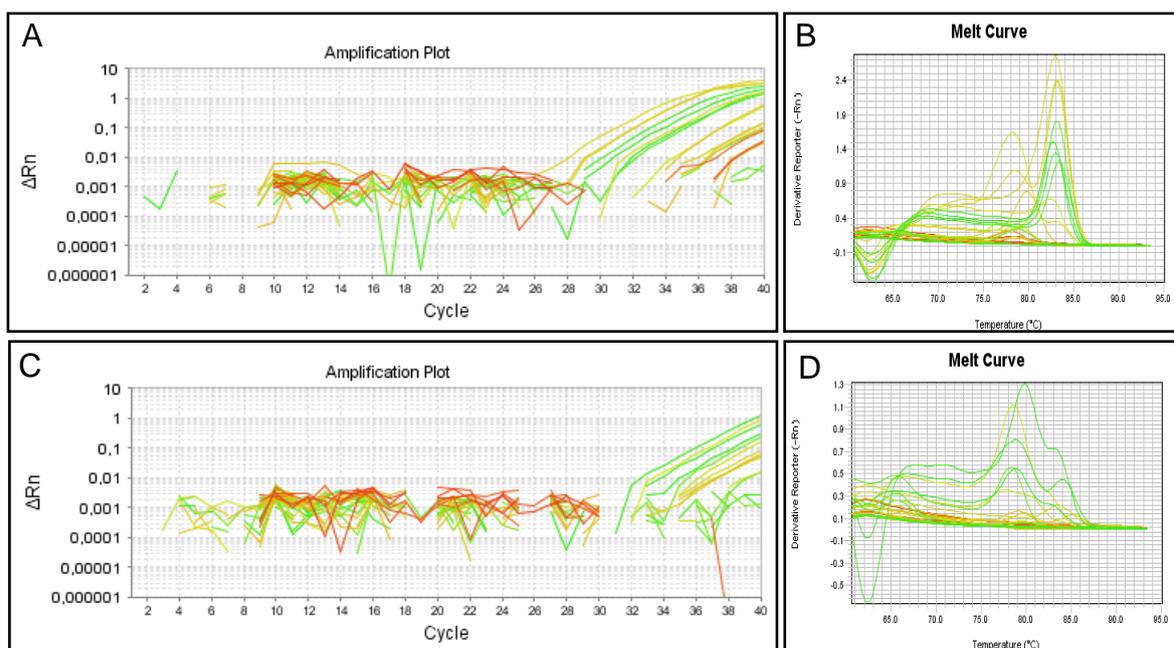


Figura 3. Amplificação e curva de *Melting* de genes alvo potencialmente envolvidos na patogenicidade de *A. niger*. Gene da celulase (A-B) e ocratoxina A (C-D).

A inexistência do material genético do fungo nas amostras estudadas pode ser explicada por não ter sido possível obter RNA do fungo tanto de plantas de sisal quanto dos discos inoculados com o fungo. Na interação entre *Moniliophthora perniciosa* e o cacaueteiro, foi observado que apenas 0,3% do RNA isolado pertencia ao fungo (Thomazella, comunicação pessoal). Talvez o kit utilizado na extração não possua a sensibilidade necessária para isolar quantidades tão pequenas de RNA. Estudos posteriores serão realizados a fim de otimizar a metodologia utilizada para a extração de RNA de *A. niger* em interação com plantas de sisal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora ainda sejam dados preliminares, esse estudo apresenta as primeiras informações sobre os genes de *Aspergillus niger* potencialmente envolvidos na patogenicidade ao sisal. Os novos *primers* apresentados possibilitarão analisar o papel dos genes responsáveis pela síntese de proteases, cutinases, celulases e a ocratoxina A durante a interação entre *A. niger* e sisal *in planta*. Mais estudos devem ser realizados a fim de otimizar a metodologia para a extração do RNA de *A. niger* inoculado nas plantas de sisal. Com a metodologia de extração ajustada, a expressão de cada enzima hidrolítica e da ocratoxina A no processo de infecção poderá ser estudado, trazendo mais informações sobre os mecanismos de patogenicidade de *A. niger* em sisal.

REFERÊNCIAS

ABARCA M.L., BRAGULAT M.R., CASTELLA G. AND CABAÑES F.J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p 2650–2652, 1994.

ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 86, p. 33-49, 2004.

ABREU, K. C. L. M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no estado da Bahia**. Tese (Doutorado em Ciências agrárias na Universidade Federal da Bahia). Cruz das Almas – BA, 106 p, 2010.

ABRUNHOSA, L; SANTOS, L; VENÂNCIO, A. Degradation of Ochratoxin A by Proteases and by a Crude Enzyme of *Aspergillus niger*. **Food Biotechnology**, v. 20, p 231–242, 2006.

ABRUNHOSA, L. J. **Estratégias para o controle de ocratoxina A em alimentos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal, 236 p, 2008.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Burlington, MA: Elsevier Academic, 2005. 922p.

AL-ANATI, L; PETZINGER, E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. **J. vet. Pharmacol. Therap.**, v.29, p 79–90, 2006.

ALQUINI, Y., BONA, C., BOEGER, M.R.T., COSTA, C.G. & BARROS, C.F. Epiderme. *In* Anatomia Vegetal (B. Appezzato-da-Glória & S.M. Carmello-Guerreiro, eds.) UFV, Viçosa, p.87-107, 2003.

ALVES, M. O.; SANTIAGO, E. S.; LIMA, A. R. M. **Diagnóstico socioeconômico da região nordestina produtora de sisal**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 75 p, 2004.

ALVES, M. O.; SANTIAGO E. G. Tecnologia e relações sociais de produção no setor sisaleiro nordestino. Artigo apresentado no **XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural**, ocorrido em Ribeirão Preto (SP), 24 a 27 de julho de 2005.

AMORIN, L. Infecção. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, cap. 15, p. 295-306, 1995.

BELTRÃO, N.E.M. A planta. In: ANDRADE, W.(Ed.). **O Sisal do Brasil**. 1.ed. Salvador: SINDIFIBRAS; Brasília: APEX-Brasil, p.25-28, 2006.

BISANDA, E. T. N.; ANSELL, M. P. Properties of sisal – CNSL composites. **Journal of Materials Science**, v.27, p.1690-700, 1992.

BLUHM, B. H; DHILLON, B; LINDQUIST, E. A; KEMA, G. H; GOODWIN, S. B e DUNKLE, L. D. Analyses of expressed sequence tags from the maize foliar pathogen *Cercospora zea-maydis* identify novel genes expressed during vegetative, infectious, and reproductive growth. **BMC Genomics**, v. 9, p. 523, 2008.

BOCK, K. R. **Diseases of sisal**. World Crops, v.17, n.1, p.64-67, 1965.

BRERA C; MIRAGLIA M; COLATOSTI, M. Evaluation of the impact of mycotoxins on human health: Sources of errors. **Microchemical Journal**, v. 59, p. 45-49, 1998.

CANTALINO, A. L.; LEÃO, A. L.; LOBO, A. C. O.; STARLING, A. L. de L. et al. **O Sisal do Brasil: Brazilian Sisal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2007.

COMMÉNIL P., BELINGHERI L., DEHORTER B. Antilipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 52, p 1-14, 1998.

CONAB. **Sisal**. Disponível em <www.conab.gov.br/conabweb/.../sureg/.../Nota_tecnica_sisal2008.pdf> Acessado em 04 de Dezembro de 2010.

COUTINHO, W. M.; LUZ, C. M.; SUASSUNA, N. D.; SILVA, O. R. F.; SUINAGA, F. A. A. **Podridão do tronco do sisal**. Embrapa Algodão, Campina Grande, 4p. (Comunicado Técnico, 281), 2006.

DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. Reversed-phase liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1024, p. 275-279, 2004.

FORSYTH, L. M. Understanding the role of induced resistance in the control of Fusarium of banana. Thesis (PhD) – University of Queensland, 2006.

FREIRE, F. C. O.; PARENTE, G. B.; CARDOSO, B. B. **Doenças da figueira (*Ficus carica* L.) no Estado do Ceará**, Circular Técnica online, n.26, Embrapa Dezembro, Fortaleza, 2006.

GAUMANN, E. **Principles of Plant Infection**. Crosby Lockwood & Son, London, 542 p, 1950.

GALLO, A.; PERRONE, G.; SOLFRIZZO, M.; EPIFANI, F.; ABBAS, A.; DOBSON, A. D. W.; MULÉ, G. Characterisation of a PKS gene which is expressed during ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 8-15, 2009.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 503–512, 2002.

GIRAUD, F.; DUPONT, J.; HAON, M.; BOUZID, O.; ALIBEU, O.; NAVARRO, D.; SAGE, L.; SIGLE-MURANDI, F.; ASTHER, M.; LESAGE-MEESSEN, L. Phylogenetic analysis of the *Aspergillus niger* aggregate in relation to feruloyl esterase activity. **Research in Microbiology**, v.158, p. 413-419, 2007.

GRIFFIN, D. H. Fungal physiology. 2ª edição. New York: John Wiley & Sons, 458p, 1994.

HYNES, M.J., MURRAY, S.L., DUNCAN, A., KHEW, G.S. AND DAVIS, M.A. Regulatory genes controlling fatty acid catabolism and peroxisomal functions in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Eukaryot. Cell**, v. 5, p. 794–805, 2006.

HUBBALLI, M; SORNAKILI, A; ANAND, S. N. T e RAGUCHANDER, T. Virulence of *Alternaria alternata* infecting noni associated with production of cell wall degrading enzymes. **Journal of Plant Protection Research**, v. 51, 2011.

KAHMANN, R; BASSE, C. Fungal gene expression during pathogenesis-related development and plant colonization. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, p. 374-80, 2001.

KARLSSON, M; HIETALA, A. M; KVAALEN, H; SOLHEIM, H; OLSON, A; STENLID, J e FOSSDAL, C.G. Quantification of host and pathogen DNA and RNA transcripts in the interaction of Norway spruce with *Heterobasidion parviporum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 70, p. 99–109, 2007.

KHOURY, A EL; ATOUI, A. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. **Toxins**, v. 2, p. 461-493, 2010.

LI, D; SIRAKOVA, T; ROGERS, L; ETTINGER, W. F e KOLATTUKUDY, P.E. Regulation of Constitutively Expressed and Induced Cutinase Genes by Different Zinc Finger Transcription Factors in *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*). **The Journal of Biological Chemistry**, V. 277, p 7905–7912, 2002.

LIMA, E. F.; MOREIRA, J. de A. N.; BATISTA, F. A. S; SILVA, O. R. R. F. da; FARIAS, F. J. C.; ARAUJO, A. E. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 2, p.109-112, 1998.

LOPEZ DE CERAIN, A.; GONZALEZ-PENAS, E.; JIMENEZ, A.M.; BELLO, J. Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. **Food Addit. Contam.**, v. 19, p. 1058–1064, 2002.

MARQUES, O. J; FILHO, P. S. V; DALPASQUALE, V. A; SCAPIM, C. A; PRICINOTTO, L. F; JÚNIOR, M. M. Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, p. 667-675, 2009.

MEDINA, J. C. **O Sisal**. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Diretoria de Publicidade Agrícola, 286 p, 1954.

MOREIRA; F. G; REIS, S DOS; COSTA, M. A. F; SOUZA, C. G. M; PERALTA, R. M. Production of hydrolytic enzymes by the plant pathogenic fungus *Myrothecium verrucaria* in submerged cultures. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p 7-11, 2005.

NUNES, M. E. T.; KIMATI, H. Doenças do alho e da cebola. In: KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M., **Manual de Fitopatologia**, v.2: Doenças de plantas cultivadas, ed. 3ª, Editora Agronômica Ceres, 776 p. São Paulo, 1997.

PASCHOLATTI, S. F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, cap.19, p. 343-364, 1995.

PERRONE, G.; SUSCA, A.; COZZI, G.; EHRLICH, K.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; MEIJER, M.; NOONIM, P.; SAMSON, R. A. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycological**, v. 59, p. 53-66, 2007.

PITT J. I. Toxigenic fungi: Which are important? **Medical Mycology**, v. 38, p 17–22, 2000.

POUSSEREAU, N; CRETON, S; BILLON-GRAND, G; RASCLE, C; FEVRE, M. Regulation of *acp1*, encoding a non-aspartyl acid protease expressed during pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Microbiology**, v. 147, p. 717–726, 2001.

REIS H., PFIFFI S., HAHN M. Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant Pathology**, v. 6, p. 257-267, 2005.

RINALDI, G.; MANCINI, E.; FERRUZZA, S.; SAMBUY, Y.; PERUZZI, G. Effect of red winw on ochratoxin A toxicity in intestinal Caco-2/TC7 cells. **Toxicology In Vitro**, v. 21, p. 204-210, 2007.

RIOUX, R; MANMATHAN, H; SINGH, P; REYES, B DE LOS; JIA, Y e TAVANTZIS, S. Comparative analysis of putative pathogenesis-related gene expression in two *Rhizoctonia solani* pathosystems. **Curr Genet**, v. 57, p. 391–408, 2011.

ROCHA, A. L. M.; PIETRO, A. D.; RUIZ-ROLDÁN, C e RONCERO, M. I. G. Ctf1, a transcriptional activator of cutinase and lipase genes in *Fusarium oxysporum* is dispensable for virulence. **Molecular Plant Pathology**, v.9, p. 293–304, 2008.

ROGERS L.M., FLAISHMAN M.A., KOLATTUKUDY P.E. Cutinase gene disruption in *Fusarium solani* f. sp. *pisi* decreases its virulence on pea. **Plant Cell**, v. 6, p 935-45, 1994.

ROLLAND, S; BRUEL, C; RASCLE, C; GIRARD, V; BILLON-GRAND, G e POUSSEREAU, N. pH controls both transcription and posttranslational processing of the protease BcACP1 in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Microbiology**, v. 155, p 2097–2105, 2009.

SÁ, J. O. **Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp.** 2009, 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia), Cruz das Almas, 2009.

SABINO, M. Micotoxinas em Alimentos. In: OGA, S. (ed.) **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, 461-472, 1996.

SANTOS, P. O dos. **Espécies de *Aspergillus* associadas à podridão vermelha do caule do sisal.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia). Cruz das Almas – BA, 68 p, 2011.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; VAN DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p.426–435, 2002.

SILVA, O.R.R.F.; SUINAGA, F.A.; COUTINHO, W.M.; CARTAXO, W. V. Cadeia produtiva. In: ANDRADE, W. (Ed.) **O Sisal do Brasil**. 1.ed. Salvador: SINDIFIBRAS; Brasília: APEX-Brasil, 2006.

SILVA, O.R.R.F.; COUTINHO, W.M.; CARTAXO, W.V.; SOFIATTI, V.; SILVA FILHO, J.L. CARVALHO, O.S.; COSTA, L.B. **Cultivo do sisal no nordeste brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 24p. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 123), 2008.

SILVEIRA, R. X. da. **Influência do resíduo líquido do sisal (*Agave sisalana* Perrine) sobre o desenvolvimento, in vitro, de nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos.** 2009. 85p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

SINDIFIBRAS. **O Projeto Sisal-Apex traz resultados positivos para as exportações baianas de sisal no primeiro trimestre do ano, que cresceram quase 40%.** Disponível em: <www.braziliANSisal.com> Acessado em: 10 de outubro de 2012.

SOARES, A. C. F.; SALOMÃO, M. S.; ALMEIDA, N. de S.; PEREZ, J. O.; GARRIDO, M. da S. ***Aspergillus niger* como agente causal de manchas foliares e podridão do pseudocaule do sisal.** In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Salvador, BA, 2006.

SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. R. F.; COUTINHO, W. M. **Cultivo de Sisal na Região Semi-Árida do Nordeste Brasileiro.** Embrapa Algodão, Campina Grande, 42p. (Sistema de Produção, 05), 2006.

TRIVEDI, A.B.; DOI, E.; KITABATAKE, N. Detoxification of ochratoxin A on heating under acidic and alkaline conditions. ***Biosci. Biotech. Biochem.***, v. 56, p. 741–745, 1992.

VAN DEN BERG, N.; BERGER, D. K.; HEIN, I.; BIRCH, P. R. J.; WINGFIELD, M. J.; VOLJOEN, A. Tolerance in banana to Fusarium wilt is associated with early up-regulated of cell wall-strengthening genes in the roots. ***Molecular Plant Pathology***, v. 8, p. 333-341, 2007.

VAN der MERWE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE, L.; SCOTT, D. B.; THERON, J. J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. ***Nature***, London, v. 205, p. 1113, 1965.

VARGA, J.; KEVEI, E.; HAMARI, Z.; TOTH, B.; TEREN, J.; CROFT, H.; KOZAKIEWICZ, Z. Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. In: SAMSON, R.A.; PITT, J.I.; **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification.** Harwood Academic Publishers, Netherlands, p. 397–411. 2000.

VARGA J., RIGÓ K., TÓTH B., TÉREN J. AND KOZAKIEWICZ Z. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. ***Food Technology Biotechnology***, v 41, p. 29–36. 2003.

ZHANG X.; BOESCH-SAADATMANDI, C.; LOU, Y.; WOLFFFRAN, S.; HUEBBE, P.; RIMBACH, G. Ochratoxin A induces apoptosis in neuronal cells. ***Genes and Nutrition***, v. 4, p. 41-48, 2009.