

ASPECTOS GERAIS DO *MONILIOPTHORA PERNICIOSA* (STAHSEL) AIME & PHILLIPS-MORA, O AGENTE ETIOLÓGICO DA VASSOURA-DE-BRUXA

VIVIAN UMBELINO MIRANDA MACEDO¹, MANOELITO COELHO DOS SANTOS JÚNIOR^{1,3}, ALEX TARANTO^{1*}, CATIANE DO SACRAMENTO SOUZA^{3,4}, RAFAELA SANTOS GALANTE^{3,4}, BRUNO S. ANDRADE^{3,4},
SANDRA APARECIDA DE ASSIS² & ARISTÓTELES GÓES-NETO⁴

^{1*}Departamento de Saúde da UEFS, Laboratório de Modelagem Molecular

²Departamento de Saúde, Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações

³Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia UEFS/ Fiocruz

⁴Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório Pesquisa Microbiológica (LAPEM)

¹⁻⁴Universidade Estadual de Feira de Santana, BR 116, Km 03, 44031-460, Feira de Santana, Bahia

*Author for correspondence: (taranto@uefs.br)

(Aspectos gerais do *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, o agente etiológico da vassoura-de-bruxa) – Este artigo registra aspectos gerais do fungo *Moniliophthora perniciosa* no Estado da Bahia, como a ocorrência da praga, ciclo biológico, métodos de controle e uma descrição detalhada de três alvos moleculares da parede celular. O objetivo é fornecer informações que possam dar apoio aos pesquisadores que pretendem iniciar projetos que têm *M. perniciosa* como tema central.

Palavras-chave: *Moniliophthora perniciosa*, cacau, vassoura-de-bruxa, alvos moleculares

(General aspects of *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, the etiologic agent of witches' broom) – This article records some general aspects of the fungus *Moniliophthora perniciosa* in the state of Bahia, such as the occurrence of the plague, its biological cycle, methods of control, and a detailed description of three molecular targets of cell wall. The objective is to provide information that can give support to researchers who intend to initiate projects having *M. perniciosa* as the central theme.

Key words: *Moniliophthora perniciosa*, cocoa, witches' broom disease, molecular targets.

INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma planta nativa da Amazônia, sendo uma espécie arbórea que tem como principal produto comercial suas amêndoas, as quais são utilizadas como matéria-prima do chocolate (SANTOS, 2005). No início do século 20, as maiores regiões produtoras de cacau do mundo eram o litoral do Equador e o estado da Bahia no Brasil (LASS, 1985), que na década de 70 estas regiões foram uma das principais fontes geradoras de divisas. Nesta época, cerca de 90% da produção cacaueira era destinada a exportação, e deste total 80% era produzido na Bahia (BASTOS, 1987). No entanto, a partir de 1989 ocorreu um decréscimo na produção do cacau, o que em parte pode ser explicado pelo surgimento e desenvolvimento do fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, que é responsável por uma doença conhecida como vassoura-de-bruxa do cacaueiro (PEREIRA *et al.*, 1990).

No sul da Bahia a cacaucultura sofreu prejuízos econômicos de larga escala devido à propagação do fungo *M. perniciosa*. A produção baiana foi reduzida em cerca de 50% no ano de 2000 (FAO, 2002), retirando o Brasil do grupo dos países exportadores de cacau e trazendo, para as regiões produtoras, complexos problemas de caráter social, econômico e ecológico (BASTOS, 1988; ANDEBRHAN *et al.*, 1999).

Com o desenvolvimento desta doença ocorreram diversos impactos, em especial na área socioeconômica (COMPANHIA DAS DOCAS DO ESTADO DA BAHIA, 2002). Neste sentido, os governos e produtores vêm discutindo medidas para resolver ou atenuar o problema nas lavouras de cacau. Uma das recomendações da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) para a reabilitação de plantas suscetíveis à vassoura-de-bruxa é o uso de variedades clonais resistentes, por meio da enxertia, combinado com aplicação de fungicidas cúpricos, como o óxido cuproso, para o controle da doença (ROSA, 1998). No entanto, este método não apresenta resultados muito satisfatórios, pois estes fungicidas não protegem tecidos em crescimento, necessitando de inúmeras pulverizações (CRONSHAW, 1979). Adicionalmente, vários compostos químicos vêm sendo testados com o objetivo de prevenir ou erradicar a vassoura-de-bruxa, porém não foram obtidos bons resultados, pois o rápido crescimento da superfície dos frutos durante os dois ou três meses de desenvolvimento do fungo faz com que o fungicida tenha que ser aplicado frequentemente, inclusive isto se torna difícil em árvores muito altas (SOBERANIS *et al.*, 2000).

O impacto social, econômico, e a falta de recursos de controle da praga incentivaram que fosse estruturada a Rede de Genômica do Estado da Bahia implantando o “Projeto Genoma do *M. perniciosa*, o fungo causador da

vassoura-de-bruxa”. A rede é estruturada com sete laboratórios (UESC, UEFS, UFBA, CEPLAC, EMBRAPA e UNICAMP) possuindo como objetivo final a elucidação de alvos moleculares (*targets*) que poderão levar ao desenvolvimento de diversas estratégias de controle da doença através do sequenciamento genético do fungo. Dentre dos diversos alvos moleculares que o fungo possa apresentar, as enzimas associadas ao metabolismo dos principais carboidratos da parede celular, quitina e glicanos, são atrativos alvos moleculares (PIROVANI *et al.*, 2005). De forma similar com o ocorrido com o desenvolvimento de antibióticos, compostos que atuam nesta via metabólica como vancomicina, β -lactâmicos, e cefalosporinas são de eficácia clínica comprovada (MOCHALKIN *et al.*, 2007). Conseqüentemente, a interferência nestes alvos promove a instabilidade da parede celular do fungo, levando à destruição das hifas. Como resultado, ocorre a inibição do crescimento do patógeno (GEORGOPAPADAKOU & TKACZ, 1995). Adicionalmente, pelo fato da célula humana não apresentar parede celular, espera-se que compostos que atuam nesta via sejam menos propensos a causar efeitos indesejados. No entanto, em relação a fungos, compostos que atuam nesta via metabólica não passaram da fase III, portanto, não alcançaram o mercado (GRIFFITH & TRACY, 2002).

A vassoura-de-bruxa é uma praga que após a sua instalação alterou a posição do Brasil de segundo maior exportador mundial de cacau para importador. A partir de então vários grupos de pesquisa se mobilizaram para

controlar o avanço da praga. Assim, o objetivo deste trabalho é fornecer um suporte aos pesquisadores sobre a literatura disponível em relação ao *M. pernicioso*, o fungo causador da vassoura-de-bruxa. Adicionalmente, relatamos os avanços iniciais do grupo obtido através do Projeto Genoma na caracterização de alvos moleculares da parede celular.

A VASSOURA-DE-BRUXA

A vassoura-de-bruxa foi observada inicialmente em 1700. No entanto, somente por volta de 1785 que a praga foi descrita pelo naturalista brasileiro Alexandre Rodrigues Ferreira. A investigação científica sobre a destruição que esta praga causa em plantações iniciou-se em 1890 por Gregor Stahel, que isolou e nomeou o fungo causador de *Marasmius pernicioso*. Este também foi detectado em diversos países, mas atualmente se distribui nas regiões da América do Sul e do Caribe podendo também ser encontrada no Panamá (PURDY, 2005).

A incidência da vassoura-de-bruxa na Bahia foi observada pela primeira vez em 1989. Neste período houve uma perda de 95% da produção do cacau (PEREIRA *et al.*, 1990; ISAAC *et al.*, 1993), e devido à alta densidade cacauzeira, aliada à falta de um período seco, houve melhores condições para o estabelecimento e propagação desta praga, porém sabe-se que há algumas variedades resistentes à doença em seu habitat natural (PURDY & SCHMIDT, 1996). Em 1996, o

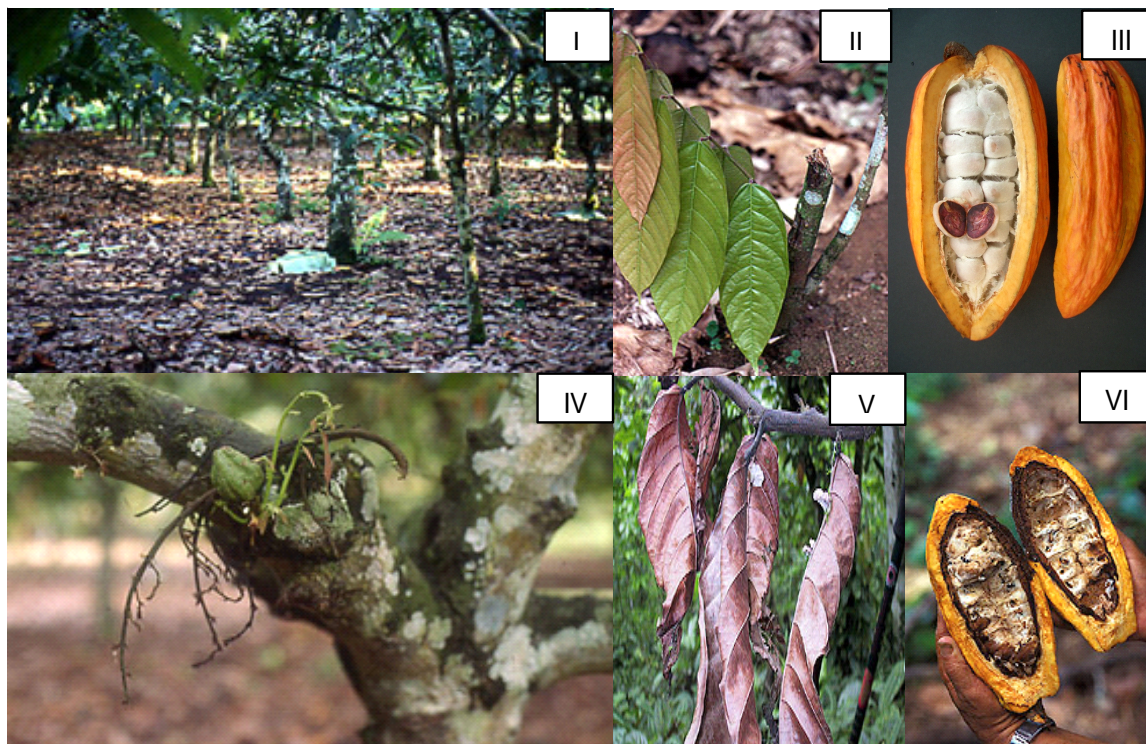


Fig. 1. Comparação entre partes do cacaueiro antes e após a infecção. Em I está mostrado uma plantação de cacau, em II folhas normais e III um fruto em perfeitas condições para consumo. IV evidencia a mudança no tronco da árvore após a infecção, assim como nas folhas e frutos, V e VI respectivamente.

Fonte: BOTANISCHER GARTEN (2007); NEW CROP (2007).

Estado da Bahia representava cerca de 84,5% da produção nacional e 15% da produção mundial de cacau.

A vassoura-de-bruxa provoca um superbrotamento das partes terminais do cacaueiro, possuindo sintoma característico à formação dos brotos hipertrofiados de excessivo desenvolvimento, aparentando vassoura – caracterizando assim, o nome da doença (Fig. 1). De início, o desenvolvimento da doença nos brotos é rápido, porém depois de 5 a 6 semanas o broto começa a secar, podendo cair ou ficar aderente à árvore (PEREIRA *et al.*, 1990). As estruturas capazes de infectar o cacaueiro em condições naturais são os basidiósporos uninucleados. A penetração dos basidiósporos no hospedeiro se dá por meio de estômatos de folhas maduras e imaturas, lesão nas superfícies adaxial e abaxial de *Theobroma cacao* L., tecidos lesados nas bases de tricomas (SREENIVASAN & DABYDEEN, 1989; PURDY & SCHMIDT, 1996; KILARU & HASENSTEIN, 2005; MEINHARDT *et al.*, 2006) e/ou diretamente nos tecidos (PURDY & SCHMIDT, 1996; ALVES, 2002). A infecção se inicia com o crescimento dos tubos germinativos dos basidiósporos em tecido meristemático da planta, como os brotos apicais, as flores e os frutos (MUSE *et al.*, 1996; ORCHARD *et al.*, 1994).

Desordens fisiológicas são frequentemente encontradas em plantas infectadas por um fitopatógeno, liberando dentro da célula grande quantidade de compostos fenólicos, etileno, açúcares solúveis e tanino levando a célula à morte (ODJAKOVA & HADJÜVANOVA, 2001; SCARPARI *et al.*, 2005), ou alterando o seu balanço hormonal. Como resultado, ocorre a hipertrofia e hiperplasia das células dos tecidos infectados. O brotamento de gemas laterais dos ramos é aumentado, dando o aspecto de uma vassoura, na qual os ramos são visivelmente mais espessos que o ramo original (LOPES, 2006).

Adicionalmente, estudos das vias de sinalização entre planta-patógeno mostraram que carboidratos possuem um papel importante na mudança da fase biotrófica para a fase saprofítica do fungo (SCARPARI *et al.*, 2005). Foi observado também que espessamento da parede celular pode provocar o adensamento da cutícula (SANTEN, 2007) e esta servir como sinalizador para o fungo reconhecer o hospedeiro.

O FUNGO *MONILIOPTHORA PERNICIOSA*

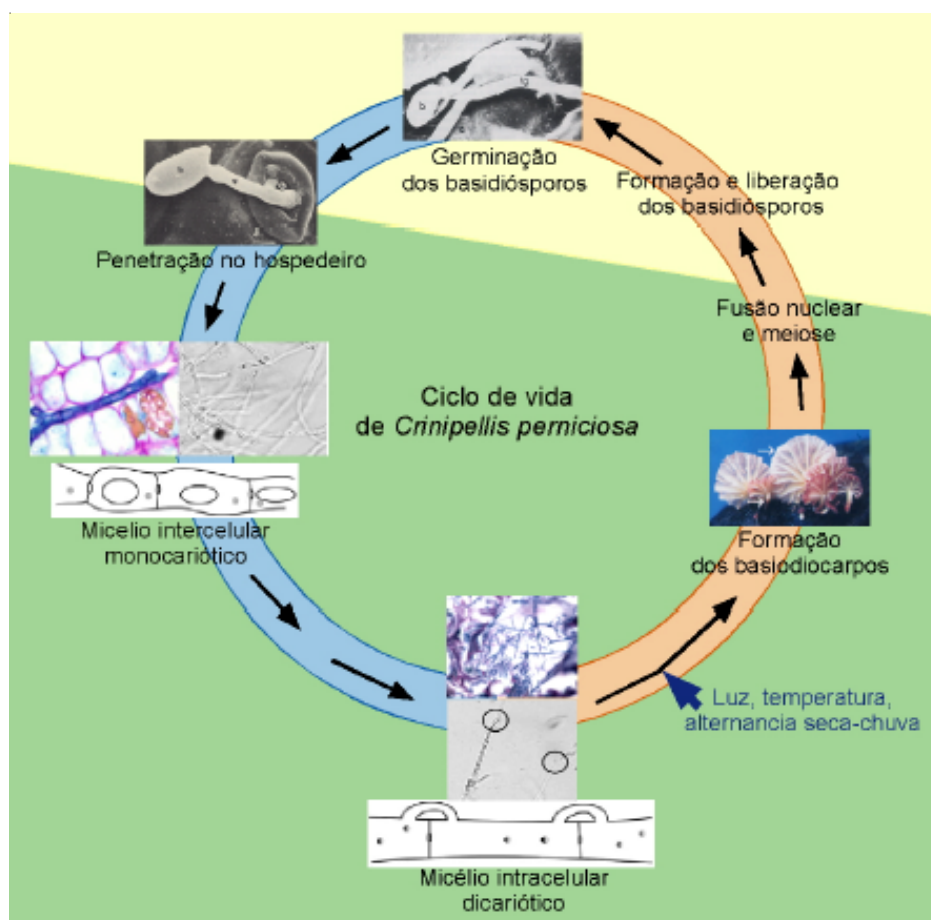


Fig. 2. Ciclo de vida do *M. pernicioso*. As partes em azul e laranja do ciclo correspondem às fases biotrófica e saprofítica, respectivamente; em verde está delimitada a parte do ciclo do fungo na sua interação com a planta do cacau; em amarelo está a parte do ciclo que ocorre fora do hospedeiro. Fonte: (LOPES, 2006).

O fungo *M. pernicioso* pertence à divisão Eumycota, subdivisão Basidiomycotina, ordem Agaricales e família Tricholomataceae (BRANDEAU, 1992; LANA, 2000). Foi inicialmente descrito como *Marasmius pernicioso* Stahel. Após a revisão do gênero *Marasmius* por Singer, a espécie foi transferida para o gênero *Crinipellis* sobre o binômio *C. pernicioso* (Stahel) Singer (PURDY & SCHMIDT, 1996; GRIFFITH *et al.*, 2003), e atualmente, como resultado de estudos de filogenia molecular de representantes de Marasmiaceae realizados por AIME & PHILLIPS-MORA (2005), é validamente reconhecido como *Moniliophthora pernicioso* (Stahel) Aime & Phillips-Mora.

Este fungo não é um parasita exclusivo do cacauzeiro, podendo ocorrer em outras plantas como Malvaceae, *T. grandiflorum* Schum. (cupuaçu) e *T. speciosum* Willd. (cacaú) (BASTOS & EVANS, 1985). Segundo a classificação de BASTOS (1988), a grande variabilidade de hospedeiros do *M. pernicioso* permite separá-lo em grupos de acordo com o gênero que infecta, denominados biótipos. O biótipo “C” afeta *T. cacao* e espécies filogeneticamente próximas, como espécies do gênero *Theobroma* (BASTOS & EVANS, 1985). Os biótipos “S” e “B” afetam, respectivamente, plantas das famílias Solanaceae e a espécie *Bixa orellana*, enquanto o biótipo “L” afeta plantas da família Bignoniaceae (principalmente *Arrabidaea verrucosa* (Standl.) A. H. Gentry), mas não causa os sintomas da praga. O biótipo “L” é heterotático (auto-estéril) e apresenta uma distribuição geográfica restrita (GRIFFITH & HEDGER, 1994).

M. pernicioso é um patógeno hemibiotrófico, cujos basidiósporos são as únicas estruturas do fungo em condições naturais capazes de infectar os tecidos meristemáticos do cacau e várias outras espécies do gênero *Theobroma* e *Herrania* (todos os membros da família Sterculiaceae). Estes são produzidos em lamelas na parte inferior do pileo do basidioma onde os dois núcleos dos compartimentos da hifa dicariótica, da camada do himênio, migram para dentro do basídio, onde ocorre a fusão nuclear (LOPES, 2006). Os basidiósporos penetram no hospedeiro ao atingirem os tecidos meristemáticos dos órgãos de plantas saudáveis e ocorre o desenvolvimento de hifas espessas, não fibuladas localizadas intercelularmente nos tecidos infectados que caracterizam o micélio primário ou biotrófico. A dicarionização do micélio ocorre após um período que varia de três a nove semanas, ocorrendo a formação de um micélio secundário, com hifas mais delgadas (1-3 µm de diâmetro) e apresentando fibulas (ansas ou grampos de conexão), que invade as células do tecido hospedeiro, levando à morte dos ramos (Fig. 2). Esta é a fase saprofítica da doença denominada “vassoura seca”.

As condições climáticas ideais para a liberação dos basidiósporos são a umidade do ar próximo à saturação e temperaturas em torno de 20 a 30°C (PURDY & SCHMIDT, 1996; GRIFFITH *et al.*, 2003). Estes são liberados à noite e sua dispersão se dá pela chuva e pelo vento. A altura em que os basidiósporos são produzidos é importante no desenvolvimento da praga (COSTAS, 1993). Na superfície do

solo as vassouras produzem poucos basidiomas, e há uma menor chance dos basidiósporos atingirem os órgãos suscetíveis. No entanto, nas áreas mais altas a disseminação atinge maiores distâncias (ANDEBRHAN *et al.*, 1993) de modo que as principais fontes de inóculo são as vassouras localizadas na copa (ANDEBRHAN, 1985; COSTAS, 1993). Em relação aos basidiósporos do *M. pernicioso*, estes não têm grande disseminação, porém devido à curta distância entre as árvores da plantação de cacau, a disseminação tornou-se mais devastadora (GRIFFITH *et al.*, 2003).

MÉTODOS DE CONTROLE DA DOENÇA

O controle adequado da vassoura-de-bruxa depende da remoção das partes infectadas, aplicação de fungicidas químicos e seleção de hospedeiros resistentes (WHEELER, 1985; RUDGARD, 1987; BASTOS, 2000). Este método de controle é de baixo custo e fácil manejo. No entanto, este se mostrou insuficiente para reduzir a disseminação do patógeno (ANDEBRHAN *et al.*, 1995), uma vez que o nível de infecção da planta determina a eficiência e o custo dessa prática (BASTOS, 1996). Adicionalmente, o método somente é efetivo quando a remoção das fontes de inóculo é realizada por todos os fazendeiros de uma determinada área (GRIFFITH *et al.*, 2003).

Diferentes compostos químicos têm sido testados na tentativa de prevenir ou erradicar a vassoura-de-bruxa, porém os resultados não são satisfatórios (MCQUILKEN *et al.*, 1998; SOBERANIS *et al.*, 2000), pois o rápido crescimento da superfície dos frutos durante os dois ou três meses de desenvolvimento faz com que o fungicida tenha de ser aplicado frequentemente, e isto é especialmente difícil em árvores muito altas (SOBERANIS *et al.*, 2000). Como alternativa, tem sido utilizado o controle biológico que envolve antagonistas capazes de suprimir a formação ou destruir os basidiomas de *M. pernicioso* em vassouras secas. Algumas espécies de *Trichoderma* sp. revelaram-se promissoras, não só no controle de fitopatógenos habitantes do solo (PAPAVIZAS, 1985) como também no controle daqueles que colonizam as partes aéreas de plantas (ELAD *et al.*, 1993). Adicionalmente, BASTOS (1996) demonstrou a eficiência de *T. viride* Pers. no controle de *M. pernicioso*, a qual houve a redução da incidência de frutos infectados em comparação com os tratamentos por poda fitossanitária.

Embora existam diversas alternativas no controle da vassoura-de-bruxa, estas ainda estão insipientes. Nenhuma forma de controle tanto químico como biológico ainda é capaz de restaurar a posição que o Brasil ocupava na produção de cacau. Este fato motiva a busca de novas alternativas de controle. Dentre elas, destaca-se a busca de novos alvos moleculares através do sequenciamento do gDNA e de cDNAs. Como resultado destas pesquisas, a estrutura tridimensional de enzimas pode ser elucidada por Modelagem Comparativa (SANTOS-FILHO & ALENCASTRO, 2003) fornecendo detalhes do sítio ativo, sobretudo da

interação ligante-receptor. De posse dessa informação, torna-se possível o desenvolvimento de compostos biologicamente ativos direcionados para atuar exclusivamente nos alvos moleculares do *M. perniciosa* levando ao controle da praga.

ALVOS MOLECULARES

Com objeto de criar novas formas de controle da doença, pesquisadores de várias instituições iniciaram o projeto genoma do *M. perniciosa*. Este projeto identifica genes muito importantes relacionados ao metabolismo do fungo, e/ou ao seu mecanismo de infecção. Muitos desses genes codificam enzimas e receptores essenciais para *M. perniciosa* e são considerados alvos moleculares para o desenvolvimento de fungicidas mais potentes e seletivos contra esse fungo. Adicionalmente, o entendimento do funcionamento do metabolismo do fitopatógeno a partir dos dados moleculares poderá levar ao desenvolvimento de diversas estratégias de controle da doença. Estudos iniciais demonstraram que as células fúngicas destituídas de parede celular somente sobrevivem em condições de laboratório, onde o suporte osmótico previne a sua lise. Estes dados sugerem a parede celular como um importante alvo na busca de uma defesa efetiva, justificada por ser essencial para os fungos e por não estar presente em mamíferos. Conseqüentemente, as rotas biossintéticas das moléculas que compõem a parede celular são alvos importantes para o desenvolvimento de agentes inibidores do crescimento destes patógenos (GEORGOPAPADAKOU & TKACZ, 1995; RONCERO, 2002). Conseqüentemente, diversos estudos vêm sendo feitos a partir do princípio que a parede celular dos fungos é um importante alvo para o desenvolvimento de potentes antifúngicos (GRIFFITH & TRACY, 2002).

Estes dados motivaram a determinação estrutural por Modelagem Comparativa (PATNY *et al.*, 2006) de enzimas

da via metabólica da síntese de quitina, o principal componente da parede celular fúngica (SOUZA, 2007). A quitina é um homopolímero insolúvel de N-acetilglicosamina (GlcNAc) unidos por ligações glicosídicas β -(1'4) (Fig. 3) (KRAMER & MUTHUKRISHNAN, 1997; HOWARD *et al.*, 2003; MERZENDORFER & ZIMMICH, 2003; ICHINOMIYA *et al.*, 2005; GOHEL *et al.*, 2006; DUO-CHAN, 2006) que formam espontaneamente estruturas cristalinas de microfibrilas (IMAI *et al.*, 2003; MERZENDORFER & ZIMMICH, 2003; MERZENDORFER, 2006) e medem aproximadamente 3,0 nm de diâmetro, sendo as cadeias de açúcares, dentro das microfibrilas, estabilizadas por ligações de hidrogênio entre os grupos amino e carbonil (MERZENDORFER & ZIMMICH, 2003; HOGENKAMP, 2006). Em fungos estas microfibrilas medem em torno de 20-400 cadeias de açúcares associadas às ligações de hidrogênio (RUIZ-HERRERA & MARTINEZ-ESPINOZA, 1999).

A quitina é sintetizada através de cinco passos consecutivos (Fig. 4): (i) conversão da frutose-6-fosfato em glicosamina-6-fosfato pela ação da frutose-6-fosfato aminotransferase (EC 2.6.1.16); (ii) acetilação da glicosamina-6-fosfato formando N-acetilglicosamina-6-fosfato catalizada pela glicose-6-fosfato acetiltransferase (EC 2.3.1.4); (iii) interconversão de N-acetilglicosamina-6-fosfato em N-acetilglicosamina-1-fosfato pela ação da N-acetilglicosamina fosfomutase (EC 5.4.2.3); (iv) uridinação da N-acetilglicosamina-1-fosfato em uridina difosfato-N-acetilglicosamina ativada (UDP-GlcNAc) catalisada pela ação da UDP-GlcNAc pirofosforilase (EC: 2.7.7.23); (v) conversão irreversível da UDP-N-acetilglicosamina em quitina através da sintase da quitina (EC: 2.4.1.16) (Mio *et al.*, 1998; YAMADA-OKABE *et al.*, 2001).

Dentre estes alvos, esforços foram direcionados para a elucidar a estrutura 3D de três enzimas: pirofosforilase, sintase da quitina, e quitinase por modelagem comparativa (SANTOS JÚNIOR, 2007; SOUZA, 2007; GALANTE, 2008).

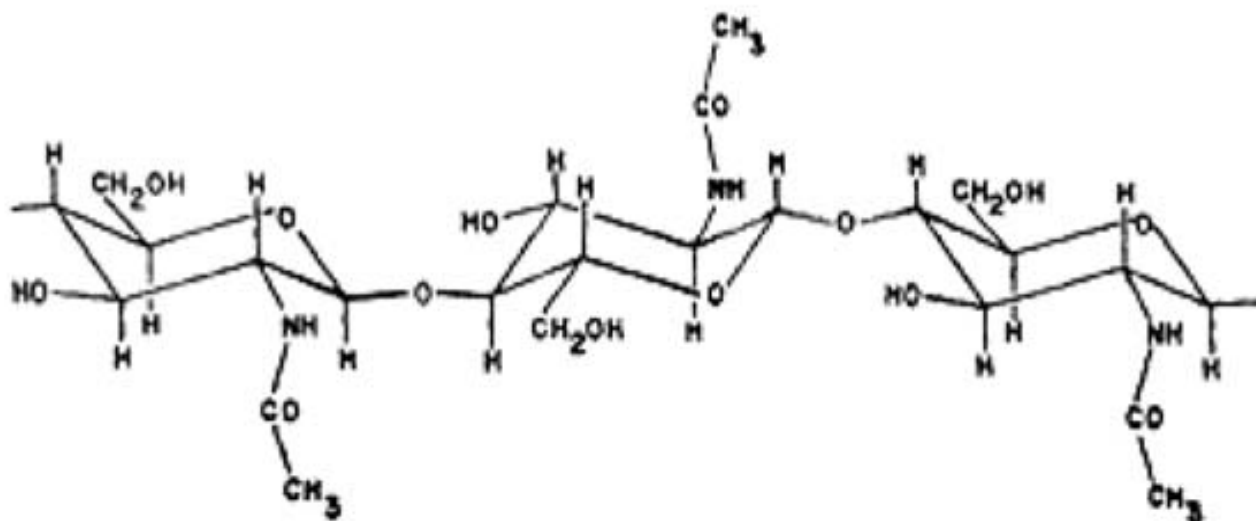


Fig. 3. Ilustração de um segmento da quitina. Fonte: TRINDADE (2005).

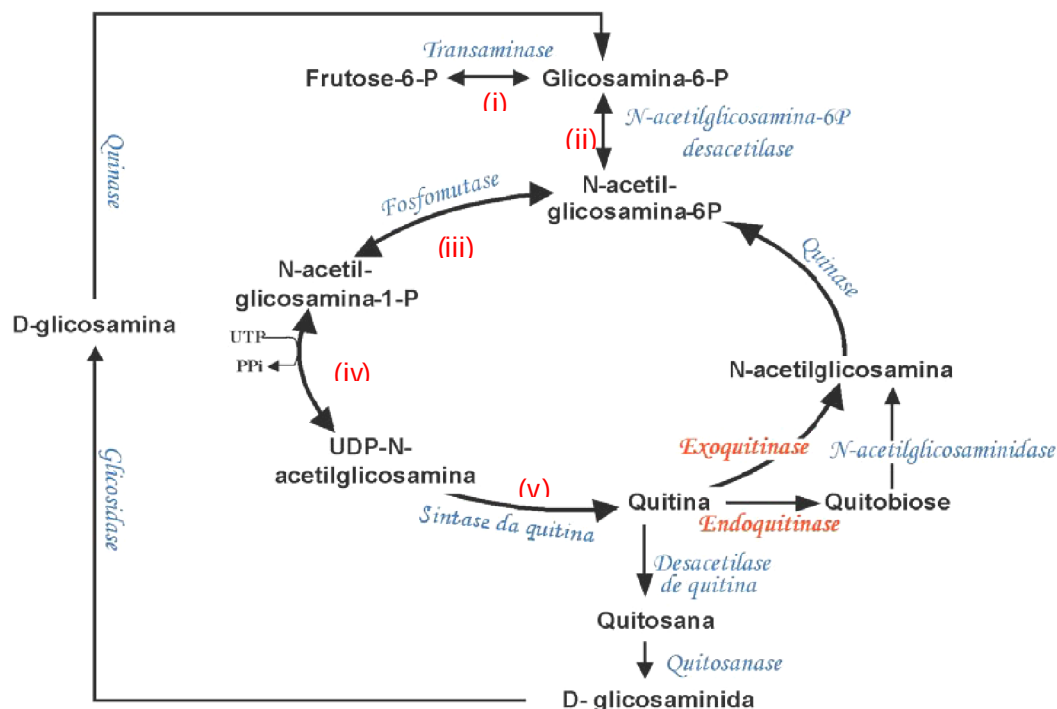


Fig. 4. Rota metabólica da quitina evidenciando as suas cinco etapas de formação. Fonte: LOPES (2006).

A enzima UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase (EC 2.7.7.23) é uma proteína da superfamília nucleotídeos-difosfo-açúcar transferase e família UDP-glicose pirofosforilase. Esta enzima é constituída de folhas beta paralela (beta/alfa/beta), segundo a *Structural Classification of Protein Database- SCOP* (RSCB, 2000). Sua purificação foi realizada a partir de cepas de *Staphylococcus aureus* cerca de 30 anos atrás. No entanto, a sequência gênica que codifica esta enzima foi elucidada a partir de genes de *Escherichia coli*, somente em 1993 (DE LUCA *et al.*, 1996).

A sintase da quitina (EC 2.4.1.16) é uma enzima que desempenha importantes funções na diferenciação e morfogênese de fungos filamentosos, como *M. perniciosus*, que possuem a quitina como principal componente estrutural de sua parede celular (RUIZ-HERRERA *et al.*, 2002). Para sua atividade, essa enzima utiliza um cátion bivalente (Mn^{+2} ou Mg^{+2}) (MERZENDORFER, 2006) e o nucleotídeo UDP-GlcNAc como doador de açúcar. A sintase da quitina pertence à família multigênica das glicosiltransferases (MÜLLER *et al.*, 2002). Com base na similaridade da sequência, a sintase da quitina pertence à família 2 (GTF2), que contém sequências de fungos, bactérias, plantas e animais. Análises filogenéticas indicam que as enzimas da GTF2 derivam de um ancestral comum (MERZENDORFER, 2006). As glicosiltransferases desta família, segundo CAMPBELL *et al.* (1997), têm seu mecanismo catalítico nos resíduos de Asp e Glu das cadeias laterais, pois estes apresentam reatividade apropriada para agir comoceptor da ativação.

A degradação direta da quitina para promover a morfogênese e alongamento das hifas, diferenciação dos

esporos e origens de carbono, em condições de inanição de alguns fungos (FELSE & PANDA, 1999), ocorre pela subsequente hidrólise das ligações β -1,4 do homopolímero de quitina, por quitinases (EC 3.2.1.14), liberando resíduos de N-acetilglicosamina (HOWARD *et al.*, 2003; MERZENDORFER & ZIMOCH, 2003; ICHINOMIYA *et al.*, 2005; GOHEL, 2006; DUO-CHAN, 2006). As quitinases, endo e exoquitinases são enzimas essenciais para o metabolismo do fungo e estão inseridas na superfamília das glicosilhidrolases (DUO-CHAN, 2006). O mecanismo de retenção da configuração anomérica do substrato é comum entre as quitinases da Família 18, encontrados em fungos e em bactérias, sendo caracterizada pela protonação do oxigênio glicosídico formando um íon intermediário (o oxazolinium íon intermediário), com posterior adição de uma base nucleofílica (Glu ou Asp), e uma segunda adição de um nucleófilo, hidrolisando a quitina e mantendo o produto com a mesma configuração anomérica (DAVIES & HENRISSAT, 1995; DAHIYA *et al.*, 2006). O inibidor competitivo, alosamidina, se liga ao íon intermediário impedindo a continuidade do mecanismo de hidrólise. No entanto, a utilização deste inibidor de quitinase em fungicidas torna-se improvável pelo elevado custo comercial (DUO-CHAN, 2006).

Embora o enfoque do presente trabalho seja as enzimas da parede celular, recentemente foi descrito um outro importante alvo molecular, DNA e RNA polimerases. Estas enzimas estão envolvidas no envelhecimento do fungo, sendo, portanto um outro atrativo alvo molecular. Estas duas enzimas foram completamente sequenciadas e seus modelos foram construídos também utilizando a Modelagem Comparativa. O sítio ativo de ambas foi caracterizado

mostrando que é possível desenvolver inibidores por *De novo design*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Grandes impactos na cultura cacaueteira na Bahia foram provocados pela vassoura-de-bruxa. Esta causou a queda de produção, aumento dos custos e gastos diretos em função do uso de medidas de controle, afetando diretamente o produtor, o preço do produto, e atingindo de forma indireta o consumidor. Além de impactos socioeconômico resultantes da menor produção de cacau, outras mudanças ocorreram na região produtora da Bahia, como: uso da terra, venda de propriedades, nível de emprego e danos ao meio ambiente.

Na busca de soluções para isto, esforços têm sido feitos para encontrar o melhor alvo molecular. Dentre eles, destacam-se enzimas, tais como a pirofosforilase, sintase

da quitina, e quitinase, todas da parede celular do fungo por ser essencial à sobrevivência de suas hifas em ambientes hostis, e por não estar presente no ser humano, sugerindo assim que este seja um atrativo alvo molecular e, conseqüentemente, uma oportunidade para o desenvolvimento racional de novos antifúngicos com a possível capacidade de controlar a vassoura-de-bruxa (ANDRADE *et al.*, 2008).

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Feira de Santana e ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia UEFS/FIOCRUZ-BA pelos incentivos dados para a construção deste trabalho. À Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelos incentivos estruturais e financeiros para o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- AIME MC & W PHILLIPS-MORA. 2005. The Causal agents of witches' broom and frosty pod of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycol.* 97(5): 1012-1022.
- ALVES SAM. 2002. **Epidemiologia da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer) em cacaueteiros enxertados em Uruçuca**, BA. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ANDEBRHAN T. 1985. Studies on the epidemiology and control of witches' broom disease of cacao in the Brazilian Amazon. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE, 9. **Proceedings...** Lagos: Cocoa Producers Alliance. p. 395-402.
- ANDEBRHAN T, AC MADDISON, R ARIAS & LA MAFFIA. 1993. Disease gradients of *Crinipellis perniciosa*. p. 157-164. In: SA RUDGARD, T ANDEBRHAN & AC MADDISON (eds.). **Disease management in cocoa: comparative epidemiology of witches's broom disease**. London: Chapman & Hall.
- ANDEBRHAN T, JF HAMMERSTONE, LJ ROMANCZYK & DB FURTEK. 1995. Sensitivity of *Crinipellis perniciosa* of procyanidins from *Theobroma cacao* L. *Phys. Mol. Plant Pathol.* 46: 339-348.
- ANDEBRHAN T, A FIGUEIRA, MM YAMADA, J CASCARDO & DB FURTEK. 1999. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*C. perniciosa*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brasil. *Eur. J. Plant. Pathol.* 105: 167-175.
- ANDRADE BS, AG TARANTO, SCS ROESSLE, A GÓES NETO & MA AVERY. 2008. Comparative modeling of DNA and RNA polymerases from *Moniliophthora perniciosa* mitochondrial plasmid. **International J. Integrative Biology**. No prelo
- BASTOS C & HC EVANS. 1985. A new pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. *Plant Pathol.* 34: 306.
- BASTOS E. 1987. **Cacau: a riqueza agrícola da América**. São Paulo: Ícone.
- BASTOS CN. 1988. **Biologia do *Crinipellis perniciosa***. Belém: CEPLAC/CEPEA.
- BASTOS CN. 1996. Potencial de *Trichoderma viridae* no controle de vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacaueteiro. *Fitop. Bras.* 21(4).
- BASTOS CN. 2000. Retrospectiva e avanços no controle da vassoura-de-bruxa do cacaueteiro. *Fitop. Bras.* 25: 305-336.
- BOTANISCHER GARTEN. 2007. ***Theobroma cacao***. Disponível em <<http://www.botanik.uni-karlsruhe.de/garten/fotos-knoech/Theobroma%20cacao%20Echter%20Kakaobaum%207.jpg>>. Acesso em: 14 mar. 2007.
- BRANDEAU J. 1992. **El cacao**. Barcelona: Blume.
- CAMPBELL JA, JG DAVIES, V BULONE & BA HENRISSAT. 1997. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. Journal* 15: 929-939.
- COMPANHIA DAS DOCAS DO ESTADO DA BAHIA. 2002. **Apresenta em estatística os principais produtos movimentados**. Disponível em <<http://www.cobeda.com.br/portoileus>>. Acesso em: 25 jan. 2005.
- COSTAS JCB. 1993. **Progresso da vassoura-de-bruxa em órgãos vegetativos do cacaueteiro em Altamira e Tomé-Açu, PA**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Viçosa.
- CRONSHAW DK. 1979. Fungicide application together with cultural practices to control cocoa disease in Ecuador. *Trop. Agric.* 56(2): 165-171.
- DAHIYA N, R TEWARI, RP TIWARI & GS HOONDAL. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl. Microb. Biotec.* 71: 773-782.
- DAVIES G & B HENRISSAT. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3(9): 853-859.
- DE LUCA C. *et al.* 1996. Overexpression, one-step purification and characterization of UDP-glucose dehydrogenase and UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase. *Bioorg. Med. Chem.* 4(1): 131-142.
- DUO-CHUAN L. 2006. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161: 345-360.
- FAO. 2002. **Production Yearbook**, v. 54, Rome.
- FELSE PA & T PANDA. 1999. Regulation and cloning of microbial chitinase genes. *Applied Microbiology Biotechnology* 51: 141-151.
- ELAD Y, DG ZIMAND, Y ZAQS, S ZURIEL & I CHET. 1993. Use of *Trichoderma harzianum* in combinations or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial green-house conditions. *Plant Pathol.* 42: 324-332.

- GALANTE RS. 2008. **Estudos de quitinases de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, fungo causador da vassoura-de-bruxa no cacau: purificação, caracterização e modelagem comparativa**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- GEORGOPAPADAKOU NH & JS TKACZ. 1995. The fungal cell wall as a drug target. **Tren. Microbiol.** 3(3): 98-104.
- GOHEL V, A SINGH, M VIMAL, P ASHWINI & HS CHHATPAR. 2006. Bioprospecting and antifungal potencial of chitinolytic microorganisms. **Afric. J. Biotec.** 5(2): 54-72.
- GRIFFITH GW & JN HEDGER. 1994. Spatial distribution of mycelia of the liana (L) biotype of the agaric *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer in tropical forest. **New Phytol.** 127: 243-259.
- GRIFFITH R & T TRACY. 2002. Antifungal drugs. In: DA WILLIAMS & L LEMKE. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 891-903.
- GRIFFITH GW. *et al.* 2003. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. **New Zeland J. Bot.** 41: 423-435.
- HOWARD MB, NA EKBORG, RM WEINER & SW HUTCHESON. 2003. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzyme. **J. Ind. Microb. Biotec.** 30: 627-635.
- HOGENKAMP DG. 2006. Chitin metabolism in insects: **chitin synthases and beta-N-acetylglucosaminidases**. Dissertation (Doctor in Phylosophy). Kansas State University. Manhattan, Kansas.
- ICHINOMIYA M, E YAMADA, S YAMASHITA, A OHTA & H HORIUCHI. 2005. Class I and class II chitin synthases are involved in septum formation in the filamentous fungus *aspergillus nidulans*. **Eukaryotic Cell**. p. 1125-1136.
- IMAI T, T WATANABE, T YUI & J SUGIYAMA. 2003. The directionality of chitin biosynthesis: a revisit. **Biochem. J.** 374: 755-760.
- ISAAC S, K HARDWICK & H COLLIN. 1993. Interactions between the pathogen *Crinipellis perniciosa* and cocoa tissue, p. 219-232. In: S ISAAC, JC FRANKLAND, R WATLING & AJS WHALLEY (eds.). **Aspects of tropical mycology**. Cambridge: Cambridge University Press.
- KILARU A & KH HASENSTEIN. 2005. Development and pathogenicity of the fungus *Crinipellis perniciosa* interaction with cacao leaves. **Biochem. Cell Biol.** 95(1): 101-107.
- KRAMER KJ & S MUTHUKRISHNAN. 1997. Insect chitinases: molecular biology and potencial use as biopesticides. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 27(11): 887-900.
- LANA TG. 2000. **Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis perniciosa***. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- LASS RA. 1985. Diseases, p. 265-365. In: GAR WOOD & RA LASS (eds.). **Cocoa**. 4ª ed. London: Longmans.
- LOPES MA. 2006. **Estudo molecular do sistema quitinolítico de *Crinipellis perniciosa***. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Santa Cruz – Ilhéus.
- MEINHARDT LW, C DE M BELLATO, J RINCONES, RA AZEVEDO, JCM CARCARDO & GAG PEREIRA. 2006. *In vitro* production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Cur. Microb.** 52: 191-196.
- MERZENDORFER H & L ZIMMICH. 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **J. Exp. Biol.** 206: 4393-4412.
- MIO T, T YABE, M ARISAWA & H YAMADA-OKABE. 1998. The eukaryotic UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylases. **J. Biol. Chem.** 273(23): 14392-14397.
- MCQUILKEN, M. P. SUPRIADI, S., RUDGARD, S. A. 1998. Sencitivity of *Crinipellis perniciosa* to two triazole fungicides *in vitro* and their effect on development of the fungus in cocoa. **Plant Pathol.** 37: 499-506.
- MERZENDORFER H. 2006. Insect chitin synthases: a review. **J. Comp Physiol B.** 176: 1-15.
- MOCHALKIN I, S LIGHTLE, Y ZHU, JF OHREN, C SPESSARD, N CHIRGADZE, Y BONATAI, M MELNICK & L McDOWELL. 2007. Characterization of substrate binding and catalysis in the potential antibacterial targets N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase (GlmU). **Protein Science** 16: 2657-2666, 2007.
- MÜLLER C, CM HJORT, K HANSEN & J NIELSEN. 2002. Altering the expression of two chitin synthase genes differentially affects the growth and morfology of *Aspergillus oryzae*. **Microbiol.** 45: 4025-4033.
- MUSE R. *et al.* 1996. Effects of the fungus *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease, on cell and tissue cultures of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Plant Pathol.** 45: 145-154.
- NEW CROP. 2007. **Tropical Beverage Crops-Cacao**. Disponível em <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/tropical/lecture_18/lec_18.html>. Acesso em 14 mar. 2007.
- ODJAKOVA ME & C HADJUVANOVA. 2001. The complexity of pathogens defense in plants. **Bulg. J. Plant Physiol.** 27(1-2): 101-109, 2001.
- ORCHARD J *et al.* 1994. Changes in morphology and measurement of cytokinin levels development of witches' broom on cocoa. (*Theobroma cacao* L.). **Plant Pathol.** 43: 65-72.
- PAPAVIZAZ GC. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potencial for biocontrol. **Annu. Rev. Phyt.** 23: 23-54.
- PATNY A, P DESAI & MA AVERY. 2006. Homology modeling of G-protein-coupled receptors and implications in drug design. **Curr. Med. Chem.** 13: 1667-1691.
- PEREIRA JL, A RAM, JM FIGUEIREDO & LCC ALMEIDA. 1990. The first occurrence of witches' broom disease in the principal cocoa growing region of Brazil. **Trop. Agric.** 67: 188-189.
- PIROVANI CP *et al.* 2005. Knowledge discovery in genome database: the chitin metabolic pathway in *Crinipellis perniciosa*. **Proceedings of International Symposium on Mathematical and Computacional Biology**.
- PURDY LH & RA SCHMIDT. 1996. Status of caco witches' broom: biology, epidemiology and management. **Annu. Rev. Phytop.**, v. 34, p. 573-594, 1996.
- PURDY LH. 2005. **Fungal disease of cacao**. Disponível em: <<http://www.cabi-commodities.org/Acc/ACCrc/PDFFiles/W-BPD/Ch1.pdf>>. Acesso em 25 abr. 2007.
- ROSA IS. 1998. **Enxertia do cacau**. Ilhéus: CEPALC/SUBES/CEPEC.
- RONCERO C. 2002. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. **Curr Genet.** 41: 367-378.
- RSCB. 2000. **RSCB Protein Data Bank**. Disponível em <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1JV1>>. Acesso em 25 abr. 2007.
- RUDGARD SA. 1987. Witches' broom disease on cocoa in Rondônia, Brazil: Infection of vegetative flushes and flower cushions in relation to host phenology. **Plant Pathol.** 36: 523-530.
- RUIZ-HERRERA J, JM GONZÁLEZ-PRIETO & R RUIZ-MEDRANO. 2002. Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeast and fungi. **FEMS Yeast Res.** 1: 247-256.
- RUIZ-HERRERA J & AD MARTÍNEZ-ESPINOZA. 1999. Chitin biosynthesis and structural organization *in vivo*. **EXS.** 87: 39-53.
- SANTÉN K. 2007. **Pathogenesis-related proteins in Barley: localization and accumulation patterns in response to infection by *Bipolaris sorokiniana***. Tese. Swedish University of Agricultural Science, Alnarp.

- SANTOS-FILHO AO & RB DE ALENCASTRO. 2003. Modelagem de proteínas por Homologia. **Quím. Nov.** 26: 253-259.
- SANTOS JUNIOR MC. 2007. **Determinação estrutural da enzima pirofosforilase do fungo *Moniliophthora perniciosa* (Sthael) (Singer) Phillips-Mora por modelagem comparativa.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- SANTOS SC. 2005. **Caracterização de hidrofobinas do fungo *Crinipellis perniciosa* (Sthael) Singer, causador da doença vassoura-de-bruxa no cacaueiro.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus.
- SCARPARI LM, LW MEINHARDT, P MAZZAFERA, AWV POMELLA, MA SCHIAVINATO, JCM CASCARD, GAC PEREIRA. 2005. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. **Journal Experimental Bot.** p. 1-13.
- SOBERANIS W *et al.* 2000. Increased frequency of phytosanitary pod removal in cocoa (*Theobroma cacao* L.) increases yield economically in eastern Peru. **Crop Protection** 18: 667-685.
- SOUZA CS. 2007. **Sintase da quitina de *Moniliophthora perniciosa* (Sthael) (Singer) Phillips-Mora: caracterização gênica e modelagem do provável sítio catalítico.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- SREENIVASAN TN & S DABYDEEN. 1989. Modes of penetration of young cocoa leaves by *Crinipellis perniciosa*. **Plant Dis.** 73(6): 478-481.
- TRINDADE MB. 2005. **Purificação, caracterização e estudos estruturais de duas novas lectinas ligantes de quitina das sementes do gênero *Artocarpus*.** Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- WHELLER BEJ. 1985. The growth of *Crinipellis perniciosa* in living and dead cocoa tissue, p. 103-116. In: D MOORE, LA CASSELTON, DA WOOD & JC FRANKLAND (eds.). **Developmental biology of higher fungi.** Cambridge: Cambridge University Press.
- YAMADA-OKABE T, Y SAKARNORIL, T MIO, H YAMADA-OKABE. 2001. Identification and characterization of the genes for N-Acetylglucosamine kinase and N-Acetylglucosamine-phosphate deacetylase in the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Eur. J. Biochem.** 268: 2498-2505.