

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



GENOMA E EFETOROMA DE SUBPOPULAÇÕES DE *Moniliophthora*
perniciosa E *Moniliophthora roreri*, AGENTES CAUSAIS DA VASSOURA
DE BRUXA E MONILÍASE DO CACAUEIRO

CESLAINE SANTOS BARBOSA

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Abril de 2018

CESLAINE SANTOS BARBOSA

GENOMA E EFETOROMA DE SUBPOPULAÇÕES DE *Moniliophthora perniciosa* E *Moniliophthora roreri*, AGENTES CAUSAIS DA VASSOURA DE BRUXA E MONILÍASE DO CACAUEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e Biologia Molecular

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Abril de 2018

B238 Barbosa, Ceslaine Santos.
Genoma e efetograma de subpopulações de
Moniliophthora perniciosa e Moniliophthora roreri,
agentes causais da vassoura de bruxa e monilíase
do cacaueteiro / Ceslaine Santos Barbosa. – Ilhéus, BA:
UESC, 2018.
vi,37 f. : il.

Orientadora: Karina Peres Gramacho.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular.
Referências: f. 33-37.

1. Cacaueteiro – Doenças e pragas. 2. Fungos
patogênicos. 3. Vassoura-de-bruxa (Fitopatologia).
4. Genoma. I. Título.

CDD 633.74

CESLAINE SANTOS BARBOSA

GENOMA E EFETOROMA DE SUBPOPULAÇÕES DE *Moniliophthora perniciosa* E *Moniliophthora roreri*, AGENTES CAUSAIS DA VASSOURA DE BRUXA E MONILÍASE DO CACAUEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e Biologia Molecular

APROVADA: 26 de abril de 2018

Dra. Fátima Cerqueira Alvim

(UESC)

Dr. Ronan Xavier Corrêa

(UESC)

Dr. Ronaldo José Durigan Dalio

(Esalq)

Dra. Karina Peres Gramacho

(CEPLAC/Uesc - Orientadora)

DEDICO

A Deus por todo o cuidado em todas as fases de minha vida. Por sua fidelidade, amor e proteção.

Ao meu avô, vovô Cesário, o meu exemplo maior de garra, dedicação, fé, compaixão e amor.

OFEREÇO

Aos meus amados pais, Ceslene e Wantecarlos, pela dedicação, suporte, atenção e amor com que me criaram. Por serem enormes incentivadores dos meus sonhos.

Aos meus queridos irmãos, Maique (Kim) e Kaio, por grandes gestos de amor que disponibilizam constantemente a mim, pelas risadas, que são tão frequente e naturais quando estamos juntos, por serem o meu suporte emocional.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dr. Karina Gramacho, pela orientação, dedicação, suporte, ensinamentos e confiança em mim;

À minha co-orientadora, Dr. Fabienne Micheli, pelos valiosos conselhos;

Aos meus colaboradores, Drs. Thiago Batista, Rute Fonseca e Mariana Barreto, que me deram um enorme suporte na pesquisa. Por toda paciência, dedicação e atenção;

À Universidade Estadual de Santa Cruz e ao programa de pós-graduação de Genética e Biologia Molecular pela oportunidade do mestrado;

Às preciosas secretárias do programa da pós-graduação, Fabrícia e Mara, que salvam nossas vidas diariamente. Por todo o empenho e dedicação com que exercem o trabalho;

À Fapesb e CAPES pelas concessões das bolsas de mestrado;

À Fapesb, CNPq e CEPLAC pelo suporte financeiro à pesquisa;

À CEPLAC/CEPEC pela parceria nas pesquisas;

Ao NBCGIB, pelas instalações e suporte técnico para a pesquisa;

Ao Centro de Bioinformática (Departamento de Biologia) da Universidade de Copenhagen na Dinamarca pelo suporte técnico e computacional da pesquisa;

À pós-graduação de Bioinformática da Universidade Federal de Minas gerais, na pessoa da Dr. Glória Regina, pelo suporte técnico e computacional da pesquisa;

Ao meu amado Deus, que bondosamente confiou lindos planos a mim e tem cumprido cada uma das suas promessas de forma surpreendentemente maravilhosa. Jamais chegaria aqui sem Ele;

Aos meus pais, Ceslene e Wantecarlos, que acreditam em mim. Por todo o cuidado, carinho e proteção. Por todo o suporte, que com muito amor me dão sempre.

Aos meus queridos irmãos, que são meus alicerces emocionais, meus companheiros e meus amores;

Aos meus avós (Marlene, Cesário, Isabel e Alcides), que demonstram um amor incondicional a mim, e por todas as suas orações, pois são elas que me mantêm de pé;

Às minhas queridas tias e queridos tios (Max Silene, Kacilene, Maria Eunice, Sara, Soraia, Bete, Elias, Elizeu), por tudo o que eles representam em minha vida, meus grandes incentivadores;

Às grandes amigas fitomolenses que fiz durante o mestrado (Elizabete, Mariana, Analine, Alezânia, Maria Júlia e Ivanna), que tornaram os meus dias mais fáceis. Por todas as confidências, paciência, apoio e diversão;

Aos meus grandes amigos da Biopreá (Edson, Caio, Valter, Raner, Letícia, Dalma e Jonathan), por todo conselho e suporte científico atrelado ao companheirismo e apoio emocional;

A todos que contribuíram, seja de forma direta ou indireta, muito obrigada!

“Porque dEle e por Ele, e para Ele, são todas as coisas. A Ele seja a glória para sempre! Amém.”

(Romanos 11:36)

ÍNDICE

EXTRATO.....	iii
ABSTRACT.....	v
INTRODUÇÃO.....	01
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
CAPÍTULO 1: Genome sequence and effectorome of <i>Moniliophthora perniciosa</i> and <i>Moniliophthora roreri</i> subpopulation.....	20
Abstract.....	20
1. Background.....	21
2. Methods.....	22
2.1 <i>Moniliophthora perniciosa</i> e <i>Moniliophthora roreri</i> isolate and DNA isolation.....	22
2.2 Data filtering, de novo assembly and mapping sequencing.....	22
2.3 Phylogenomics.....	23
2.4 Identification of candidate secreted effector proteins.....	23
3. Results.....	23
3.1 <i>De novo</i> genome sequencing and phylogenomics.....	23
3.2 Candidate secreted effector proteins.....	23
3.3 Functional characterization of CESP.....	25

3.4 Core effectors.....	27
3.5 Exclusive effectors.....	27
4. Discussion.....	28
5. Conclusion.....	29
6. References.....	30
CONCLUSÕES.....	32
REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES.....	33

Extrato

BARBOSA, Ceslaine Santos, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, abril de 2018. **GENOMA E EFETOROMA DE SUBPOPULAÇÕES DE *Moniliophthora perniciosa* E *Moniliophthora roreri*, AGENTES CAUSAIS DA VASSOURA DE BRUXA E MONILÍASE DO CACAUEIRO** Orientadora: Karina Peres Gramacho. Co-orientadora: Fabienne Micheli. Colaboradores: Rute R da Fonseca e Thiago Mafra Batista.

As duas doenças mais devastadoras do cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) são causadas pelos fungos hemibiotróficos *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da doença da Vassoura de Bruxa do Cacaueteiro (VBC), e o seu táxon irmão *Moniliophthora roreri*, responsável pela Monilíase do Cacaueteiro (MC). Fungos patogênicos de plantas interagem com seus hospedeiros principalmente por meio da secreção de efetores, portanto a detecção e caracterização funcional *in silico* de candidatos a efetores é um passo importante para entender o modo de ação dos fitopatógenos. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo reportar o sequenciamento do genoma de seis isolados de subpopulações do gênero *Moniliophthora* sendo: i) dois isolados de *M. perniciosa* do cacaueteiro, que diferem em virulência/agressividade ao cacaueteiro na Bahia, e um isolado de *M. perniciosa* do Equador, iii) dois isolados representativos de subpopulações de *M. perniciosa* em hospedeiros solanáceos, definidas por Patrocínio et al. (2017) e iv) um isolado representante de *M. roreri* do Peru (grupo Bolívar segundo Phillips-Mora et al. (2007)). Como também predizer o repertório de proteínas secretadas candidatas a efetores (PSCEs). Múltiplas abordagens de bioinformática foram combinadas para predizer PSCEs entre os isolados de *M. perniciosa* e

M. roreri e aqueles conservados entre espécies/subpopulações de *Moniliophthora*. Para a predição de PSCEs, as proteínas com peptídeo sinal na região N-terminal direcionadas à secreção e não retidas na região transmembrana foram preditas como proteínas secretadas, que para serem consideradas efetores precisou preencher pelo menos um dos seguintes critérios: (i) Ter sinal de localização nuclear (NLS), (ii) Ser pequena e rica em cisteína (SCR) e (iii) Ser proteína contendo repetições (RCP). Os PSCEs também foram preditos pelo EffectorP, software treinado para distinguir proteínas efetoras secretadas em fungos fitopatogênicos. A caracterização funcional dos PSCEs foi realizada com o BLAST2GO. Com o orthoVenn foi possível identificar clusters ortólogos entre os PSCEs dos seis isolados, e os exclusivos de cada isolados e de cada subpopulação. O repertório de PSCEs identificados em *M. perniciosa* foi: 157 e 134 proteínas em cacauzeiros da Bahia, 109 em cacauzeiros do Equador, 92 e 80 em isolados de solanáceos selvagens (lobeira e caiçara, respectivamente). *Moniliophthora roreri* teve o maior número de candidatos a efetores, um total de 243 proteínas. Também foram encontradas um grande número de enzimas degradadoras da parede celular características de fungos hemibiotróficos. Destas, destacamos as proteínas envolvidas na modificação da parede celular, um verdadeiro arsenal enzimático que permite ao fitopatógeno habitar ambientes com estresse oxidativo, que promovem a degradação de compostos vegetais e facilitam a infecção. Um conjunto de oito efetores foi compartilhado entre todos os isolados de *Moniliophthora*, enquanto outros foram compartilhados entre os isolados solanáceas selvagens ou em isolados de cacau. Em sua maioria, os candidatos a efetores de *M. perniciosa* foram compartilhados entre as subpopulações, enquanto *M. roreri* apresentou quase 50% de exclusividade da espécie. O presente trabalho fornece uma base de dados do efetoroma putativo de subpopulações do gênero *Moniliophthora*, um primeiro passo para a compreensão do patossistema dessas duas doenças devastadoras do cacauzeiro.

Palavras-chave: fatores de patogenicidade, fitopatógenos, Monilíase do Cacauzeiro, *Theobroma cacao* e Vassoura de Bruxa do Cacauzeiro.

Abstract

BARBOSA, Ceslaine Santos, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, abril de 2018. **Genome and effectorome of *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri* subpopulations, causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao.** Advisor: Karina Peres Gramacho. Advisor Committee Members: Fabienne Micheli, Rute R da Fonseca, Thiago Mafra Batista.

The two most devastating diseases of the cacao (*Theobroma cacao*) are caused by the hemibiotrophic fungi *Moniliophthora perniciosa*, causal agent of Witches' Broom Disease of Cacao (WBD) and its brother taxon *Moniliophthora roreri*, causal agent of the frosty pod rot of cacao, also known as Moniliasis of Cacao. Plant pathogenic fungi interact with their hosts mainly through the secretion of effectors, so the detection and *in silico* functional characterization of effector candidates is an important step to understand and control their pathogenicity. Thus, this work aimed to report six genomic of *Moniliophthora* isolates: i) two *M. perniciosa* isolates that differ in pathogenicity level in Bahia cacao plants; (ii) one isolate of *M. perniciosa* from Ecuador; (iii) two representative isolates of *M. perniciosa* subpopulations from solanaceous hosts; and iv) an representative isolated of *M. roreri* from Peru (Bolivar group). These genomic data provide an important source for predicting the repertoire of candidates secreted effector proteins (CSEPs) of interest for future studies. Multiple bioinformatics approaches were combined to predict CSEPs between the isolates of *M. perniciosa* and *M. roreri* and those conserved among *Moniliophthora* species/subpopulations. For the prediction of CSEPs, the signal peptide proteins in the N-

terminal region directed to the secretion, and not retained in the transmembrane region were predicted as secreted proteins. To be considered as effectors a protein should fulfilled at least one of the following criteria: (i) have a nuclear localization signal (NLS), (ii) small and cysteine rich (SCR) and (iii) proteins containing repeats (PCR). CSEPs were also predicted by EffectorP software trained to distinguish effector proteins secreted in plant pathogenic fungi. The functional characterization of the CSEPs was performed with BLAST2GO. With orthoVenn it was possible to identify orthologous clusters between the CSEPs of the six isolates, and the unique ones of each isolates and each subpopulation. The repertoire of CSEPs identified in *M. perniciosa* were 157 and 134 proteins in cacao in Bahia, 109 in cacao in Ecuador, 92 and 80 in wild solanaceous isolates (lobeira and caiçara, respectively). *Moniliophthora roreri* had the highest number of candidate effectors, a total of 243 proteins. In addition, a large number of cell wall degrading enzymes characteristic of hemibiotrophic fungi were found. Of these, we highlighted the proteins involved in the modification of the cell wall, an enzymatic arsenal that allows the plant pathogen to inhabit environments with oxidative stress, which promote the degradation of plant compounds and facilitate the infection. A set of eight effectors were shared among all *Moniliophthora* isolates, while others were shared either between wild solanaceous isolates or cacao isolates. For the most part, the candidates for *M. perniciosa* effectors were shared among the subpopulations, while *M. roreri* presented almost 50% exclusivity of the species. The present work provides a database of the putative effectoroma of subpopulations of the genus *Moniliophthora*, a first step in understanding the plant pathosystems of these two devastating diseases of cacao.

Keywords: Frosty Pod Disease, pathogenicity factors, plant pathogens, *Theobroma cacao* and Witches' Broom Disease.

1. Introdução

As duas doenças mais devastadoras do cacaueteiro (*Theobroma cacao*) são causadas pelos basidiomicotas *Moniliophthora* (ex *Crinipellis*) *perniciosa* (Stahel) Aime Phillips-Mora, agente causal da Vassoura de Bruxa do Cacaueteiro (VBC) e o seu táxon irmão *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al., responsável pela Monilíase do Cacaueteiro (MC) (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005). *Moniliophthora perniciosa* e *M. roreri* apresentam estilos de vida semelhantes. Ambos são fungos hemibiotróficos com dois tipos de micélio nos dois tipos fases: a biotrófica ou parasítica, com micélio mais espesso crescendo intercelularmente, e a fase necrotrófica com micélio menos espesso e crescimento inter e intracelularmente. Os esporos são as únicas estruturas, encontradas em condições de campo, capazes de infectar o cacaueteiro. Porém, ao contrário de *M. perniciosa*, que é capaz de infectar diversos órgãos da planta provocando superbrotamento, hipertrofia nos ramos, frutos e almofadas florais, *M. roreri* só causa doença nos frutos do cacaueteiro.

O ciclo de vida de *M. perniciosa* se completa quando há a formação dos basidiomas. Os esporos são produzidos na superfície das lamelas situadas na parte inferior (himenóforo) do píleo ou chapéu dos basidiomas, em células especializadas denominadas basídios, de onde são liberados ativamente (ejetados) (MEINHARDT et al., 2008). *Moniliophthora roreri* não produz basidiomas, os esporos são desenvolvidos no pseudoestroma, uma camada de micélio branca e espessa que cobrem a superfície do fruto. Enquanto *M. roreri* infecta somente os gêneros *Theobroma* e *Herrania* (família *Malvaceae*), *M. perniciosa*, além desses, infecta espécies hospedeiras das famílias *Solanaceae*, *Malpighiaceae*, *Bignoneaceae* e *Bixaceae*.

Durante o processo de infecção, a interação patógeno-hospedeiro é modulada por moléculas da planta e dos microrganismos que interagem entre si. As plantas suscetíveis a um patógeno, não reconhecem moléculas do invasor e por consequência o sistema imunológico

vegetal é suplantado e assim a doença é desenvolvida. Em caso de resistência, a planta reconhece moléculas do patógeno e ativa a defesa, mantendo-a sadia.

As moléculas do patógeno que são capazes de modular a resposta imunológica do hospedeiro chamam-se de efetores, e são responsáveis pela eficiência do patógenos em infectar e colonizar células da planta. A definição de efector está em constante evolução com o aumento da compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na patogenicidade. Neste trabalho, considerou-se efetores como “moléculas liberadas ou associadas a um organismo que modificam a fisiologia de outro organismo” (DALIO et al., 2014a), para obter nutrientes, suprimir a defesa da planta, facilitando a infecção (fatores de virulência ou toxinas) e/ou provocando defesas vegetais (fatores de avirulência: Avr). Fungos biotróficos e hemibiotróficos produzem efetores que suprimem a resposta imune primária da planta, e após a penetração induzem genes associados a supressão da morte celular. Porém, os necrotróficos e nos estágios avançados dos hemibiotróficos, produzem efetores que levam a morte do hospedeiro (KAMOUN, 2006).

O sequenciamento de genomas completos combinado às ferramentas de bioinformática têm sido metodologias eficazes para a predição do conjunto de candidatos a efetores de um organismo (efetoroma). Park (2013) afirma que a disponibilidade de dados genômicos de diferentes isolados do mesmo patógeno é essencial para descobrir a variação genômica intrínseca à patogenicidade de certas espécies/subpopulações/populações de fungos. Nesta perspectiva, este trabalho teve como objetivo reportar o sequenciamento do genoma de seis isolados de subpopulações do gênero *Moniliophthora* sendo: i) dois isolados de *M. perniciosa* do cacauero, que diferem em virulência/agressividade ao cacauero na Bahia, e um isolado de *M. perniciosa* do Equador, iii) dois isolados representativos de subpopulações de *M. perniciosa* em hospedeiros solanáceos, definidas por Patrocínio et al. (2017) e iv) um isolado representante de *M. roreri* do Peru (grupo Bolivar segundo Phillips-Mora et al. (2007). Como também predizer o repertório de proteínas secretadas candidatas a efetores (PSCs). Os objetivos específicos foram:

- (i) Obter seis genomas montados e anotados do gênero *Moniliophthora*;
- (ii) Apresentar uma lista do repertório de candidatas a proteínas efectoras secretadas do gênero *Moniliophthora*, subpopulações de *M. perniciosa* e *M. roreri*;

(iii) Identificar PSCEs comuns entre todos os isolados de *Moniliophthora* deste estudo e comuns entre subpopulações de *M. perniciosa*;

2. Revisão bibliográfica

Theobroma cacao (cacau) é uma espécie endêmica de florestas tropicais da América do Sul, que possui grande interesse econômico devido o aproveitamento de suas sementes para a produção de seus subprodutos, incluindo a manteiga de cacau e o chocolate. O cacauzeiro foi domesticado na América Central há aproximadamente 3.000 anos (HENDERSON et al., 2007). Devido a sua importância econômica, a dispersão mundial do cacauzeiro abrange diversos países, desde territórios das Américas Central e do Sul, Ásia, África e Caribe. Na América do Sul, a região produtora encontra-se na faixa do Equador. No sul da Bahia, o cacauzeiro foi introduzido em 1746 pelo colono francês Frederico Warneau, onde encontrou condições edafoclimáticas semelhantes às da região de origem, que favoreceram seu estabelecimento e produção (ANDRADE, 2003). Rapidamente, o cacau tornou-se geração de renda. A região é marcada pelo crescimento acelerado da cultura, chegando a ocupar 650 mil hectares, sendo produzido em 29 mil propriedades, onde cada 5 hectares absorvia um trabalhador. Tornou-se responsável por 60% do PIB (produto interno bruto) da Bahia (MARTINS, 2007).

Até o início do século XX, as maiores regiões produtoras de cacau do mundo eram o litoral do Equador, Amazônia e a Bahia, no Brasil, sendo o último responsável por cerca de 80% da produção nacional (WOOD; LASS, 1985). Essas regiões sofreram um declínio significativo da produção devido à doença da Vassoura de Bruxa do Cacauzeiro (VBC), causada pelo basidiomicota *Moniliophthora perniciosa* (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005).

Outra doença devastadora é a Monilíase do cacauzeiro (MC). Embora, até pouco tempo a MC tenha recebido menos atenção que a VBC, não significa que seja menos danosa. Em regiões onde essas duas doenças co-ocorrem, há mais perdas de frutos para a MC e o controle é mais difícil que na VBC, devido o primeiro sintoma geralmente ser a lesão pulverulenta na MC (MADDISON et al., 1995). Assim como a VBC, a MC disseminou-se ao longo das regiões costeiras da América do Sul e recentemente por áreas adjacentes da Amazônia

Brasileira – até o momento ainda indene da doença – tornando sua chegada ao Brasil uma questão de tempo.

O gênero *Moniliophthora*

O gênero *Moniliophthora* abarca os dois fitopatógenos mais importantes à cultura do cacaueteiro, são as espécies *Moniliophthora (ex Crinipellis) perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora (2005) e *Moniliophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson & Benny (1978) - agentes causadores da VBC e da MC (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005).

O gênero *Moniliophthora* foi descrito pela primeira vez por Evans et al. (1978) para acomodar um suposto estado anamorfo ou assexuado de um novo basidiomicota desconhecido, que posteriormente foi denominado *Moniliophthora roreri*, antes classificado no filo Ascomycota como *Monilia roreri* por Ciferri e Parodi (1933). Com base em análises avançadas de microscopia ótica de varredura foi possível comprovar a presença de esporos basipétalos, em vez de acropétalos, e septos do tipo doliporo, confirmando a sua afiliação aos Basidiomicotas (EVANS et al., 1978).

Em 2005, Aime e Phillips-Mora (2005) baseando-se nas análises comparativas de cinco regiões nucleares (28S rDNA, 18S rDNA, ITS, RPB1, and EF1-a) comprovaram que as espécies *Crinipellis perniciosa* (atual *M. perniciosa*) e *Moniliophthora roreri* eram de fato táxons irmãos. Esses dois fungos foram então acomodados em uma linhagem dentro da família *Marasmiaceae*.

Moniliophthora perniciosa foi inicialmente classificado como *Marasmius perniciosus*, em 1915 por Stahel, e posteriormente com base, entre outras características, na presença de pêlos amilóides na cutícula do píleo, foi reclassificado por Singer em 1942 como *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer. Ficou conhecido assim até em 2005, quando Aime e Phillips-Mora (2005), com base na análise multigênica de DNA, provou que este fungo está filogeneticamente mais próximo de *Moniliophthora roreri* e mais distante das espécies do gênero *Crinipellis*, reclassificando-o como *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora (2005). Esses dois fungos formam uma linhagem separada dentro da família *Marasmiaceae*, que inclui vários membros que pertenciam ao gênero *Crinipellis* seção *Iopodinae* (MEINHARDT et al., 2008).

Considerando as similaridades genéticas observadas entre *M. pernicioso* e *M. roreri*, Evans et al. (2013) redescreveram o gênero *Moniliophthora* com a finalidade de acomodar as espécies *M. roreri* e *M. pernicioso* no mesmo gênero. Esta é apresentada aqui de forma sucinta, a descrição genérica proposta de *Moniliophthora* H. C. Evans, Stalpers, Samson & Benny Can. J. Bot. 56: 2530 (1978) emend. H. C. Evans, J. L. Bezerra & R.W. Barreto (2013) é que o gênero é pertencente ao filo Basidiomycota, classe Agaricomycetes, ordem Agaricales e família Marasmiaceae. Espécies deste gênero possui micélios intercelulares, espessos, sem grampos de conexão e monocarióticos ou micélios intracelulares, estreitos, retos, geralmente com grampos de conexões e dicarióticos. Os Basidiomas são agaricóide ou pseudoestromal; e se desenvolvem em tecidos hospedeiros vivos ou mortos. Os basidiósporos, formados nas lamelas dos himenóferos, são hialinos, elipsóides, de paredes finas, inamilóide. Nas formas não agaricóides, os basidiomas são formados em um pseudoestroma com basídio modificado, produzindo esporos em cadeias basipetais; meiosporos globosos a subglobosos, sub-hialinos, de paredes espessas e pulverulentos.

Aspectos gerais de *Moniliophthora pernicioso*

Moniliophthora pernicioso é um fitopatógeno amplamente conhecido por causar a doença da Vassoura de Bruxa do Cacaueiro (VBC). A VBC é originária da Amazônia, tendo sido notificada oficialmente em 1904 (Went, 1904) que relatou sua ocorrência, em 1895, no Suriname quando provou-se que os esporos desse fungo eram capazes de infectar os tecidos do cacaueiro e poderiam levar aos sintomas de crescimento dos tecidos vegetativos ou "vassouras de bruxas" das almofadas florais e meristemas. A doença disseminou-se rapidamente pelos próximos 30 anos nas Américas tropicais, causando graves perdas na produção de cacau nos países da América do Sul e Central, principalmente nos principais produtores como Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Peru, Panamá, Guiana, Granada, Ilhas do Caribe, Trinidad e Tobago (MEINHARDT et al., 2008).

A doença foi detectada pela primeira vez em 1989 no sul da Bahia e devido às condições extremamente favoráveis ao seu desenvolvimento, rapidamente alcançou proporções epidêmicas reduzindo a produção de amêndoas no estado de ~ 450.000 toneladas de cacau para ~ 90.000 (PEREIRA et al., 1989; REVIZAN; MARQUES, 2002), assim o Brasil passou da condição de exportador de cacau para o de importador do produto

(REVIZAN; MARQUES, 2002). A disseminação da VBC ocorreu eficientemente nesta região devido à predominância de cacauzeiros da variedade comum e condições adequadas de clima para o desenvolvimento da doença (PIRES et al., 1995).

Moniliophthora perniciosa é um fungo com estilo de vida hemibiotrófico, ou seja, coloniza o tecido vegetal vivo (fase biotrófica), e mais tarde cresce saprofiticamente em tecidos mortos, formando basidiomas (EVANS, 1980). Nas lamelas situadas na parte inferior (himenóforo) do píleo ou chapéu dos basidiomas, em células especializadas denominadas basídios, são produzidos os basidiósporos. Os basidiósporos são liberados ativamente (ejetados) geralmente entre as 18:00 e 6:00 horas, sendo levados pelas correntes aéreas (disseminação) necessitando serem depositados rapidamente sobre os pontos de infecção do hospedeiro (meristema apical, flores, e frutos). Nestes locais, germinam e penetram nos tecidos da planta hospedeira colonizando o apoplasto das células (fase biotrófica), induzindo sintomas em gemas vegetativas, almofadas florais, flores e frutos. Nas brotações vegetativas, as infecções induzem a hipertrofia do ramo, com emissão de lançamentos curtos e brotações laterais, com folhas apresentando, na sua maioria, crescimento reduzido (SILVA et al., 2002). Nesta fase o fungo é monocariótico e não apresenta grampo de conexão. Em estágio avançado, o fungo torna-se saprotrófico (ou necrotrófico) colonizando as células inter e intracelularmente, induzindo a morte dos ramos o que denomina-se de vassoura seca. Nesta fase os micélios são dicarióticos com presença de grampos de conexão (CALLE et al., 1982; MEINHARDT et al., 2008) e formando as vassouras secas. Os tecidos secos quando expostos aos efeitos alternados de chuva e sol, podem produzir basidiomas, favorecendo a infecção pelo fungo (BASTOS, 1990; NIELLA et al., 1999) (Figura 1).

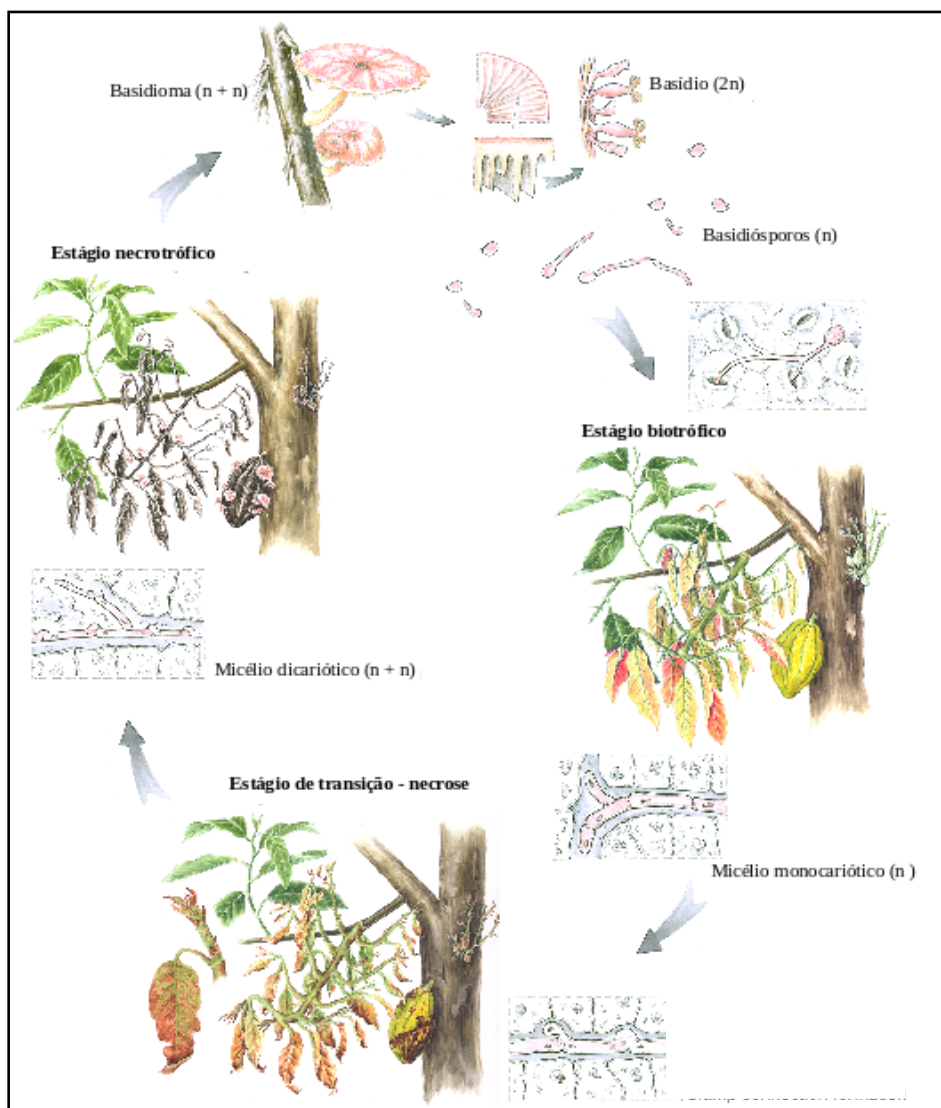


Figura 1: Ciclo de vida de *M. perniciosa* – Adaptado de Teixeira; Thomazella e Pereira (2015).

Além do cacaueteiro, o patógeno também infecta outros hospedeiros. Dentre as famílias de hospedeiras relatadas encontram-se as espécies da família *Solanaceae*; o fitopatógeno foi relatado infectando as solanáceas olerícolas como jiló (*Solanum gilo*), berinjela (*Solanum melogena*), pimentão (*Capsicum annum*), pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*); e as solanáceas silvestres: lobeira (*Solanum lycocarpum*), jurubeba (*Solanum paniculatum*) e caiçara (*Solanum stipulaceum*) (BASTOS; EVANS, 1985; EVANS, 1978). As famílias Malpighiaceae, Bignoneaceae e em *Arrabidae verrucosa*; Bixaceae (até então, exclusivamente a *Bixa orellana*) também são infectadas por *M. perniciosa* (EVANS, 1978;

GRIFFITH; HEDGER, 1994a; GRIFFITH; HEDGER, 1994b). Esse fungo apresenta uma grande plasticidade fenotípica e alta variabilidade genética dentro/entre os biótipos (RINCONES et al., 2006). Assim *M. pernicioso* possui quatro biótipos: o biótipo-C que infecta, predominantemente, o gênero *Theobroma* e *Herrania*; o biótipo-S as espécies da família *Solanaceae*, o biótipo-L, é predominante saprofítico, infectando lianas e cipós das famílias *Malpighiaceae*, *Bignoneaceae* e *Arrabidae verrucosa*; e o biótipo-B infecta *Bixa orellana* (família *Bixaceae*). Estudos anteriores apontaram que o biótipo S e C são geneticamente mais semelhantes entre eles que entre os outros biótipos (DE ARRUDA et al., 2003) podendo haver inoculação cruzada entre isolados de diferentes hospedeiros. Mas, a patogenicidade de isolados das solanáceas silvestres lobeira e caiçara ao cacau ainda não foi comprovada (PATROCINIO, 2016).

Aspectos gerais de *Moniliophthora roreri*

Enquanto na região oriental do norte da América do Sul as plantações de cacau estavam sendo altamente acometidas pela VBC, na costa do Pacífico do Equador no século XIX, uma nova doença estava trazendo problemas a cultura do cacau, a MC, causada por *M. roreri*. Embora a doença tenha sido registrada pela primeira vez no Equador, esta é originária da Colômbia (PHILLIPS-MORA; AIME; WILKINSON, 2007). A MC já foi relatada nos principais países produtores de cacau da América do Sul e Central, com exceção do Brasil, ainda que este seja cercado por países com essa doença (como Equador, Colômbia, Bolívia e Peru) (EVANS, 2016). Mas, a MC já se encontra a uma distância de 50 km do Brasil, com grande risco de chegada ao país (EVANS, 2016).

Os danos causados pela MC são tão severos, que apesar do cultivo de cacau ser acometido por várias doenças, a MC é considerada a mais perigosa (SÁNCHEZ-MORA; GARCÉS-FIALLOS, 2012). Na Nicarágua, esta é uma das principais doenças que infectam o cacau podendo causar perdas que variam de 30 a 100% na produção de frutos de cacau (NAVARRO; MENDOZA, 2006). No Peru, esta é a doença que mais afeta a plantação de cacau, com danos de 16 a 80% na produção (IICA, 2006). No Equador, os danos podem chegar de 60% a 80% (MAG/IICA, 2001). Esses dados evidenciam o efeito desse fungo na economia de regiões produtoras de cacau, indicando a necessidade de busca de medidas de prevenção e mitigação dessa doença devastadora.

O ciclo de vida de *M. royeri* se inicia a partir dos esporos que são principalmente dispersos através do vento. Os esporos são depositados na superfície do fruto, que na presença de água germinam e penetram o tecido do fruto através de estômatos, se desenvolvendo entre as células do córtex (SÁNCHEZ-MORA; GARCÊS-FIALLOS, 2012; Albuquerque et al., 2005). Nessa fase do ciclo de *M. royeri*, o período de incubação é caracterizado, a depender das condições climáticas e resposta do hospedeiro, e dura de três a oito semanas, (JOHNSON et al., 2008). Os frutos são mais suscetíveis à infecção nas fases iniciais de seu desenvolvimento (45 dias), e à medida que ocorre o crescimento do fruto, este se torna menos suscetível ao patógeno.

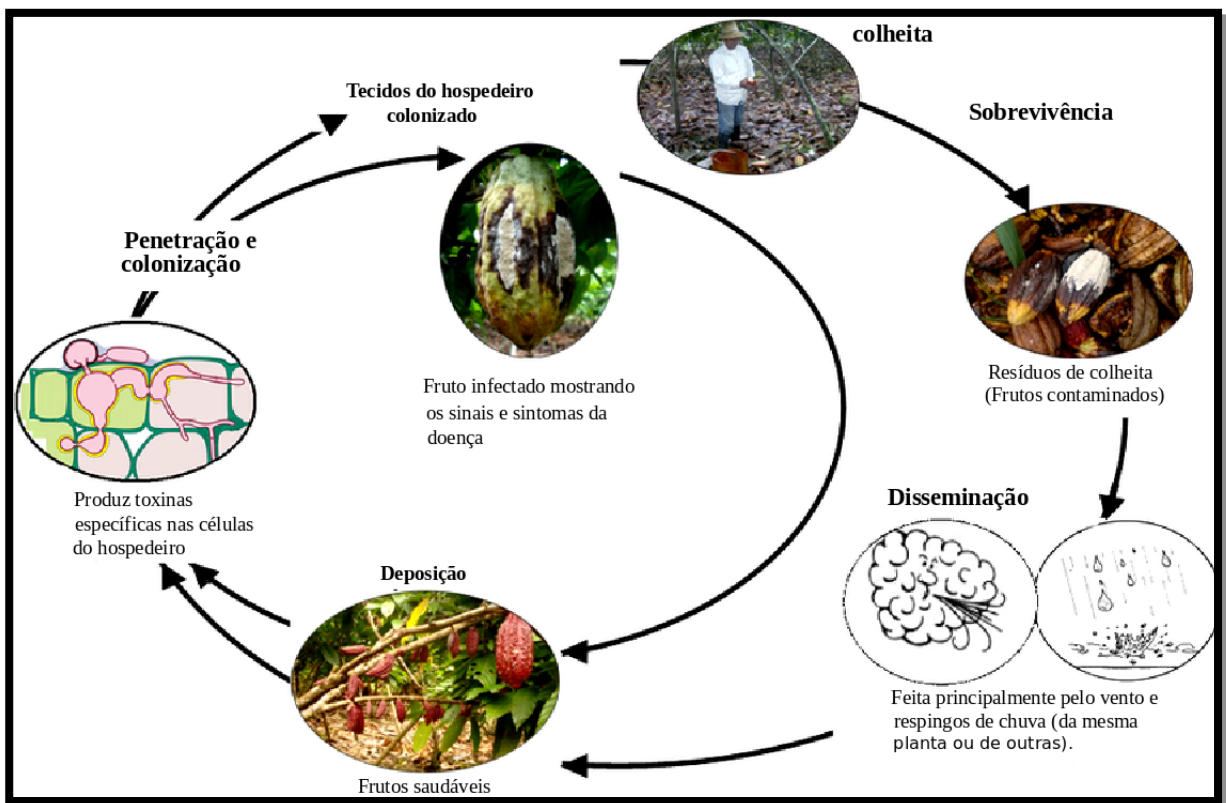


Figura 2: Ciclo de vida de *M. royeri*, agente causal da Monilíase do Cacaueiro – Adaptado de Sánchez-Mora; Garcês-Fiallos (2012).

Em frutos jovens (com menos de dois meses), apresentam inchamentos na superfície dos frutos, que se tornam descoloridos e mais brilhantes que o restante do tecido. Em seguida, manchas marrons aparecem espalhadas pelo fruto. Em frutos infectados entre a terceira e

quarta semana de desenvolvimento, os sintomas são inicialmente pequenos pontos oleosos translúcidos (manchas azeitoadas), que em seguida se juntam e formam manchas marrons irregulares, com bordas amareladas. Após poucos dias de formadas (no geral, três a seis), nestas manchas forma-se um pseudoestroma, inicialmente branco evoluindo a cor creme contendo uma massa de esporos. Esses esporos são tão abundantes que em um centímetro quadrado de fruto, há 7 a 43 milhões de esporos, que em condições ambientais adequadas estarão aptos a infectar outros frutos da mesma ou de outras plantas (FUNDACIÓN HONDUREÑA DE INVESTIGACIÓN AGRÍCOLA, 2012).

Frutos adultos, com mais de três semanas, o sintoma mais comum é uma mancha marrom (sem sinal de manchas oleosas), que pode encobrir todo o fruto. Essa mancha se difere dos sintomas causados por *Phytophthora spp.* (agente causal da podridão parda), pois apresenta bordas irregulares, e não bem definidas como em *Phytophthora*. Outro sintoma da MC é a aparência de maturação do fruto prematuramente, devido a sua mudança de cor, embora ainda não tenha nem tamanho e nem idade para a colheita. O dano interno é muito mais severo que o externo, podendo haver perda total das amêndoas (FUNDACIÓN HONDUREÑA DE INVESTIGACIÓN AGRÍCOLA, 2012).

Phillips-Mora et al. (2007), usando perfis de AFLP e ISSR de 94 isolados de *M. royeri* da América do Sul e Central, dividiu *M. royeri* em cinco grupos distintos: Gileri (Equador), Co-Central (Colômbia Central), Co-Leste (Santander, no Leste da Colômbia), Co-Oeste (oeste da Colômbia, centro do Equador, América Central) e o Bolívar (norte de Santander na Colômbia, leste Venezuela, Equador periférico e Peru).

Mecanismos de interação planta-patógeno

Fitopatógenos possuem a capacidade de reconhecer sinais das plantas para iniciar uma infecção (DALIO et al., 2014a). Estes infectam plantas para retirar os nutrientes necessários para desempenhar suas atividades vitais. Para acessá-los e estabelecer a patogenicidade, os fungos seguem alguns passos que podem ser cruciais à infecção: (1) inicialmente fixa-se à superfície da planta; (2) nesta ocorrerá a germinação dos esporos e haverá formação de estruturas de infecção que (3) possibilita a penetração do hospedeiro rompendo as barreiras externas (cutícula e parede celular) culminando (4) na colonização do tecido hospedeiro (SCHAFER, 1994; PORTO, 2016). Em geral, os fungos podem infectar as plantas de forma

direta e indireta. Na forma direta eles alcançam o interior do hospedeiro por meio de aberturas naturais (estômatos, por exemplo) ou através de feridas na superfície da planta. E podem penetrar indiretamente, secretando enzimas hidrolíticas, toxinas e hormônios que auxiliarão no processo infeccioso. O sucesso na colonização trará alterações morfo-fisiológicas na planta, levando ao surgimento dos sintomas da doença (SCHAFER, 1994; PORTO, 2016).

Por sua vez, a planta reconhece estruturas e substância do patógeno, conhecidas como PAMPs (*pathogen associated molecular pattern*) ou MAMPs (*pathogen or microbe associated molecular patterns*) de forma a responder imunologicamente ao invasor, sendo essa a primeira linha de defesa vegetal (DALIO et al., 2014a). Xilanase induzida por etileno (EIX) e oligossacarídeos de fungos, como glucanas e fragmentos de quitina na parede celular foram descritos como PAMPs (SHAN et al., 2007; DALIO et al., 2014a). Os PAMPs são reconhecidos por PRRs (*pattern recognition receptor*) – moléculas, geralmente, ancorados à superfície da membrana celular vegetal ou na região intracelular, que desencadeiam uma cascata de sinalização para a ativação da resposta imune contra o organismo invasor (HOGENHOUT et al., 2009). Essa, então, é a primeira linha de defesa da planta, sendo uma resposta defensiva rápida e efetiva.

Embora a defesa desencadeada por reconhecimento de PAMPs – PTI (*PAMP-triggered immunity*) seja eficiente para prevenir a infecção, alguns patógenos adaptados adquirem a habilidade de suprimi-la através da produção e secreção de proteínas efetoras, as quais contribuem para a virulência do patógeno, resultando na suscetibilidade desencadeada por efetores – ETS (*effector triggered susceptibility*) (DALIO et al., 2014a). Por outro lado, as plantas desenvolvem proteínas de resistência (Proteína R) que reconhecem os efetores e respondem à ação do patógeno. A relação entre efetores e proteínas de resistência é do tipo patógeno-específico, denominada assim, pois as Proteínas R são ativadas somente quando entra em contato com o patógeno, levando a uma imunidade desencadeada por efector – ETI (*effector triggered immunity*). Os efetores, por sua vez, quando são suprimidos pela ação das Proteínas R, novos outros efetores são secretados pelo patógeno, e por consequência, novas Proteínas R serão desenvolvidas pelo hospedeiro e esse processo pode se repetir indefinidamente, levando ao processo de coevolução desse patossistema, sendo esse, um fator importante para a diversidade de proteínas efetoras no processo de evolução do patógeno (DALIO; OSSWALD, 2013).

Imunidade desencadeada por efetores (ETI)

Existem muitas discussões para determinar o termo efector, de modo que a definição seja mais precisa. O termo foi criado quando ao estudarem o sistema de secreção tipo III de bactéria Gram-negativas, uma proteína que desencadeia uma resposta de hipersensibilidade no hospedeiro, foi então relacionada a função de avirulência. Contudo, essa mesma proteína foi observada tendo função de virulência em condição de suscetibilidade. Houve assim, a necessidade de um termo que caracterizasse bem essa condição, desde então o termo “efetor” tem sido amplamente aceito entre os fitopatologistas (DALIO et al., 2014a).

Kamoun (2009) define efetores de uma forma flexível, como moléculas que alteram a estrutura e a função das células do hospedeiro, o que facilita a infecção (fatores de virulência ou toxinas) e/ou desencadeia respostas de defesa (fatores de avirulência ou elicitores). Dalio et al. (2014a) discute a definição dada por Kamoun (2009), optando por uma outra definição, já que considera que nem todos efetores são secretados, e nem todos os organismos alvos são hospedeiros. Então define efetores como “*moléculas liberadas ou associadas a um organismo que modificam a fisiologia de outro organismo*”.

Os efetores são divididos em duas classes distintas baseadas no seu local de atuação, em apoplásticos e citoplasmático. Os efetores apoplásticos atuam no espaço extracelular, enquanto o citoplasmático no interior da célula hospedeira (DALIO et al., 2014a). Os fungos biotróficos e hemibiotróficos produzem efetores que suprime a resposta imune primária da planta, e após a penetração induzem genes associados a supressão da morte celular. Porém, os hemibiotróficos em estágios posteriores e os necrotróficos podem produzir efetores que levam a morte do hospedeiro (SPERSCHNEIDER et al., 2015).

A função dos efetores apoplásticos foram associados com inibidores enzimáticos em resposta às enzimas hidrolíticas, como glucanases, quitinases e proteases, que são secretadas pela planta contra o patógeno (as PRs – pathogenesis-related). As proteínas pequenas e ricas em resíduos de cisteínas também foram associadas a efetores apoplásticos, pois as pontes dissulfídicas formadas pelas cisteínas dão estabilidade à molécula no apoplasto da planta, o qual é rico em proteases degradativas, podendo induzir resposta à defesa vegetal (KAMOUN, 2006).

Em geral, os efetores fúngicos são altamente polimórficos, uma característica atribuída a sua rápida adaptação ao hospedeiro (SPERSCHNEIDER et al., 2015). Contudo, fungos e oomicetos apresentam alguns motivos conservados, são eles o RxLR, RxLx[EDQ], DEER, [KRHQSA][DENQ]EL, [Y/W]xC, e RSIVEQD (SONAH et al., 2016). Esses motivos são comumente encontrados em efetores citoplasmático, segundo Kamoun (2006) eles estão envolvidos com o processo de entrada da molécula dentro da célula, interagindo com moléculas e estruturas da célula do hospedeiro.

A biologia de efetores ainda não é muito bem compreendida, mesmo com um grande progresso nessa área nos últimos anos. Porém, atualmente, é possível encontrar alguns padrões estruturais e/ou funcionais em comum dentre os efetores, permitindo determiná-los. Nessa perspectiva, Saunders et al. (2012), baseando em proteínas efetoras conhecidas de patógenos filamentosos, desenvolveu um pipeline de predição de efetores. Nesse pipeline, para uma molécula ser considerada efetora, precisa ter, pelo menos, um desses critérios: (i) conter um sinal de secreção, (ii) ser codificada por genes induzidos pelas plantas, (iii) ter semelhança com proteína haustorial, (iv) ser pequena e rica em cisteínas, (v) conter um motivo efetor conhecido ou um sinal de localização nuclear, (vi) ser codificada por genes com regiões intergênicas longas, (vii) conter repetições internas e (viii) não apresentar domínios de PFAM, exceto os associados à patogenicidade.

Sob a justificativa de que a predição de efetores em fungos é um desafio pela falta de características padrões observadas entre eles, Sperschneider et al. (2016) desenvolveram um software, o EffectorP (<http://effectorp.csiro.au>), para prever efetores a partir de proteínas secretadas pelo patógeno. O EffectorP é um programa pioneiro na aplicação de *machine learning* na identificação de efetores de fungos, tendo especificidade e sensibilidade acima de 80%, sendo um programa promissor para tais predições.

Interação *Moniliophthora* spp. x Cacaueiro

A resistência genética é a melhor medida de controle da VBC e MC. As respostas do hospedeiro durante a interação com o patógeno é dinâmica, os genes de resistências (R) da planta tem a expressão induzida em resposta a presença do microrganismo, onde interagirá especificamente com os efetores deste, desenvolvendo uma resposta de defesa da planta. O

patógeno, portanto, dribla ou suprime as duas linhas de defesa da planta. Essas mudanças resultam em genótipos resistentes. Em caso de suscetibilidade, o hospedeiro não reconhece o patógeno e a doença é desenvolvida. Assim, moléculas do patógeno e do hospedeiro interagem constantemente durante o processo infeccioso, esta interação determinará ou não o estabelecimento da doença. Por conseguinte, é importante entender tanto o processo de infecção quanto a história evolutiva da interação planta-patógeno.

Por muito tempo, o conhecimento da patogenicidade de fungos estava relacionada somente com a sintomatologia, desenvolvimento de estruturas de infecção especializadas, secreção de enzimas hidrolíticas e produção de toxinas (DALIO et al., 2014b). Porém, a visão de patogenicidade de fungos filamentosos mudou ao compreender que microrganismos possuem uma capacidade sofisticada de manipulação das células vegetais (KAMOON, 2007). Fitopatógenos secretam proteínas, ou efetores, capazes tanto de suprimir a resposta imune do hospedeiro como também permitem ao patógeno suportar o crescimento nos tecidos hospedeiros e processo de colonização.

Sabe-se, que assim como as bactérias, os patógenos eucarióticos produzem um arsenal de efetores que modulam a imunidade inata do hospedeiro e possibilita a infecção (BIRCH et al., 2006). Cada vez mais, a necessidade de decifrar a biologia do conjunto de efetores de organismos patogênicos (efetoroma), tem se tornado imprescindíveis para a compreensão da interação patógeno-hospedeiro, e assim entender as bases moleculares do patossistema. Atualmente, com o avanço da bioinformática, a predição de efetoromas têm aumentado significativamente, contribuindo com maior conhecimento sobre os patossistemas em estudo.

Na interação do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e *Cladosporium fulvum*, modelo da interação planta-patógeno, já se sabe que esse patógeno secreta um Avr2 que interage diretamente com a Rcr^{pim}, uma protease presente no apoplasto do tomateiro, e a inibe. Os tomateiros resistente à ação de *C. fluvum* apresentam a proteína Cf2 (proteína de resistência) que responde imunologicamente contra o patógeno e o Avr2 não induz a doença, enquanto aquelas plantas que não possuem a Cf2, as consideradas suscetíveis, são incapazes de se defender contra o fungo e desenvolve a doença (SONG et al., 2009).

Pirovani (2008) indica que existem várias proteínas no apoplasto de folhas de cacauzeiro induzidas pela presença de *M. pernicioso*, mostrando que em fases iniciais dessa interação há elevada atividade enzimática, dentre elas quitinases, glucanases e peroxidases.

Bem como, importantes mecanismos de defesa são ativados em plantas resistentes de cacau, mantendo-as sadias, enquanto nas suscetíveis são suprimidos, estabelecendo a doença. Comprovando a modulação da resposta do hospedeiro com a presença do patógeno.

Alvim (2009) ressalta que a quantidade e os tipos de proteínas secretadas por *M. pernicioso* são também dependentes do tipo de fontes de carbono disponíveis para o desenvolvimento desse fungo, sendo o glicerol o maior indutor de secreção de proteínas envolvidos com necrose nos tecidos do hospedeiro na fase dicariótica (necrotrófica). Indicou ainda, que o glicerol foi a única fonte, dentre outros testados, que induziu a necrose em meristemas de cacau resistentes a *M. pernicioso*. Além de alterar a composição e estrutura da parede celular do micélio, tornando-a mais resistente a estresses em parede celular, bem como o micélio apresentou maiores níveis de transcrição de catalase, conferindo resistência a estresses oxidativos. Sendo sugestivo que o ambiente e as condições em que o fitopatógeno está imerso interfere diretamente como irá responder e agir frente ao patossistema.

Um grupo de onze genes encontrados no genoma de *M. pernicioso* apresentaram homologia com genes PR-1 de plantas. As proteínas PR-1, codificadas por esses genes, pertencem a uma superfamília denominada CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1), essa superfamília está presente em vários seres eucarióticos. Dentre esses genes encontrados em *M. pernicioso*, algumas mostraram-se expressar de maneira intensa e específica durante a interação com o cacau, sugerindo um papel para as proteínas PR-1 no processo infeccioso. Uma das funções putativas dessas proteínas incluem a neutralização das defesas das plantas, atividade antimicrobiana para evitar competidores e fisiologia do corpo frutífero. Neste estudo, demonstrou evidências sobre a importância de genes homólogos a PR-1 em fungos para determinar a virulência em plantas (TEIXEIRA et al., 2012).

Clones de cacauzeiros resistentes à MC estão sendo plantados na América Central, e para compreender se clones de cacauzeiros resistentes à *M. roreri* induzem um padrão diferencial de expressão gênica nesse patógeno, Bailey et al. (2014) avaliaram a resposta molecular de *M. roreri* frente esses clones durante a infecção. Realizaram análise de RNA-Seq, onde foi identificado 873 genes de *M. roreri* diferencialmente expressos entre clones suscetível e tolerante. Genes que codificam fatores de transcrição, proteínas de choque térmico, transportadores, enzimas que modificam membranas ou paredes celulares e enzimas

metabólicas, foram diferencialmente expressos entre os clones. Indicando que a resposta de *M. royeri* é especificamente modulada de acordo com o tipo de clone que hospeda o fungo.

Sequenciamento de genomas: Next Generation Sequencing – NGS

O avanço nas técnicas de sequenciamento genômico associado a redução de seu custo, tem possibilitado o sequenciamento de vários microrganismos de interesse biotecnológico, fitossanitário e de saúde pública dentre outros. Por meio do sequenciamento de genomas completos de fungos fitopatogênicos e com um conjunto de ferramentas de bioinformática é possível prever genes envolvidos com a patogenicidade, e assim melhor compreender o processo infeccioso em que este está envolvido (DALIO et al., 2014).

Com os genomas de *M. pernicioso* e *M. royeri* sequenciados por Mondego et al. (2008) e Meinhardt et al. (2014), respectivamente, foi possível revelar características gerais presentes nos genomas desses fungos. As proteínas preditas pelos genomas de *M. pernicioso* e *M. royeri* foram comparadas por Meinhardt et al. (2014), a fim de compreender a relação genômica desses dois fungos próximos taxonomicamente, e foi revelado uma alta similaridade entre os genomas. Dos genes codificadores de proteínas encontrados em *M. royeri*, 93% apresentam similaridade de sequências com genes que codificam as proteínas de *M. pernicioso* e 92% dos genes codificadores de proteínas em *M. pernicioso* possuem similaridade de sequência com genes codificadores de proteínas de *M. royeri* (MEINHARDT et al., 2014).

O sequenciamento do genoma de *M. pernicioso*, foi realizado em colaboração com vários laboratórios brasileiros no projeto genoma da Vassoura de Bruxa (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>), para aumentar o conhecimento dessa doença. O genoma montado por Mondego et al. (2008) revelou um tamanho de 26,66 Mbp organizado em 8 cromossomos, posteriormente foi melhorado por Meinhardt et al. (2014), revelando um genoma com tamanho de 44,6 Mbp e 17.008 genes preditos. Uma parcela significativa do genoma demonstrou ser genes envolvidos na adaptação ao estresse e necrose das plantas, características necessárias para um fungo hemibiotrófico cumprir seu ciclo infeccioso. No mesmo trabalho, identificaram genes que codificam proteínas envolvidas na retrotransposição, resistência de espécies reativas de oxigênio (ROS), transporte de efluxo de drogas e degradação da parede celular. Encontraram ainda, putativos polipeptídeos secretados

pequenos e ricos em cisteínas, bem como carboxilesterases e repertórios de enzimas degradadoras de parede celular vegetal como acontece em outros fungos hemibiotróficos (MONDEGO et al., 2008).

O sequenciamento de *M. roreri* oriundo do Equador revelou um genoma com tamanho de 52,3 Mbp e 17.910 genes preditos. Dentre o secretoma predito, evidenciou-se que de 1.535 genes que codificam proteínas putativas secretadas nesse fungo, 1.355 foram expressas nas fases biotrófica e necrotrófica. As proteínas secretadas putativas observadas na fase biotrófica apresentou ação na quebra da matriz intercelular e modificação dos micélios fúngicos, a fim de, possivelmente, mascarar o fungo e impedir as defesas da planta. E na fase necrotrófica, supõe-se estar relacionadas com ataque ativo contra as paredes e componentes celulares da planta, resultando em necrose. Resultados esses, que mostram a quantidade e os tipos do arsenal de proteínas secretadas que podem atuar durante o processo infeccioso (MEINHARDT et al., 2014). Com esses trabalhos genômicos dos fungos *M. pernicioso* e *M. roreri*, e com os próximos que virão, poderão ser a chave para a compreensão do patossistema envolvendo cacau, e assim diminuir os severos danos que afetam a plantação dessa tão importante comóditte.

Os genótipos dos patógenos desempenham papel fundamental no processo de infecção dos tecidos dos hospedeiros. Este trabalho de dissertação é uma continuidade de estudos anteriores realizados por Patrocínio (PATROCÍNIO, 2016) que, durante seu doutorado, dedicou-se a estudar a história evolutiva de isolados de *M. pernicioso* de diferentes espécies hospedeiras. O estudo analisou uma coleção de 203 isolados (sendo 63 haplótipos) utilizando marcadores do tipo microssatélites, o que possibilitou identificar cinco subpopulações de *M. pernicioso* agrupadas por hospedeiro, são estas: CS – solanáceas cultivadas, JU – jurubebas, CA – caiçaras, LO – lobeiras e TH – cacaueiro, cupuaçuzeiro e herrania (isolados que infectam a família malvaceae). Patrocínio 2016 avaliou as subpopulações com base na reconstrução das relações evolutivas dos espécimes, por meio dos métodos de máxima verossimilhança e de inferência Bayesiana, e verificou a existência de pelo menos duas linhagens notoriamente distintas

A genômica comparativa de genótipos de *M. pernicioso* representantes destas subpopulações descritas por Patrocínio (PATROCÍNIO, 2016) e *M. roreri*, é uma ferramenta fundamental para desvendar os processos adaptativos desses fitopatogenos. Este entendimento


possibilitará delinear programas visando o desenvolvimento de variedades resistentes e novas medidas de controle desses fitopatógenos.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Genome sequence and effectorome of *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri* subpopulations

Ceslaine Santos Barbosa^{1,2}, Rute R. da Fonseca^{3,4}, Thiago Mafra Batista⁵, Mariana Araújo Barreto^{1,2}, Caio Suzart Argolo¹, Mariana Rocha de Carvalho^{1,2}, Daniel Oliveira Jordão do Amaral¹, Edson Mário de Andrade Silva¹, Enrique Arévalo-Gardini⁶, Karina Solis Hidalgo⁷, Glória Regina Franco⁵, Carlos Priminho Pirovani¹, Fabienne Micheli^{1,8} and Karina Peres Gramacho^{1,2*} 

Abstract

Background: The hemibiotrophic pathogens *Moniliophthora perniciosa* (witches' broom disease) and *Moniliophthora roreri* (frosty pod rot disease) are among the most important pathogens of cacao. *Moniliophthora perniciosa* has a broad host range and infects a variety of meristematic tissues in cacao plants, whereas *M. roreri* infects only pods of *Theobroma* and *Herrania* genera. Comparative pathogenomics of these fungi is essential to understand *Moniliophthora* infection strategies, therefore the detection and in silico functional characterization of effector candidates are important steps to gain insight on their pathogenicity.

Results: Candidate secreted effector proteins repertoire were predicted using the genomes of five representative isolates of *M. perniciosa* subpopulations (three from cacao and two from solanaceous hosts), and one representative isolate of *M. roreri* from Peru. Many putative effectors candidates were identified in *M. perniciosa*: 157 and 134 in cacao isolates from Bahia, Brazil; 109 in cacao isolate from Ecuador, 92 and 80 in wild solanaceous isolates from Minas Gerais (Lobeira) and Bahia (Caiçara), Brazil; respectively. *Moniliophthora roreri* showed the highest number of effector candidates, a total of 243. A set of eight core effectors were shared among all *Moniliophthora* isolates, while others were shared either between the wild solanaceous isolates or among cacao isolates. Mostly, candidate effectors of *M. perniciosa* were shared among the isolates, whereas in *M. roreri* nearly 50% were exclusive to the specie. In addition, a large number of cell wall-degrading enzymes characteristic of hemibiotrophic fungi were found. From these, we highlighted the proteins involved in cell wall modification, an enzymatic arsenal that allows the plant pathogens to inhabit environments with oxidative stress, which promotes degradation of plant compounds and facilitates infection.

Conclusions: The present work reports six genomes and provides a database of the putative effectorome of *Moniliophthora*, a first step towards the understanding of the functional basis of fungal pathogenicity.

Keywords: *Theobroma cacao*, Witches' broom, Frosty pod rot, Pathogenicity factors, Plant pathogens

* Correspondence: gramachokp@hotmail.com

¹Departamento de Ciências Biológicas (DCB), Centro de Biotecnologia e Genética (CBG), Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, Ilhéus 45662-900, Bahia, Brazil

²Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), Seção de Fitossanidade (SEFIT), Laboratório de Fitopatologia Molecular (FITOMOL), km 22 Rod. Ilhéus Itabuna, Ilhéus 45600-970, Bahia, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Witches' Broom (WB) and Frosty Pod Rot (FPR) diseases of cacao; respectively caused by *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime Phillips-Mora (2005) and *Moniliophthora roreri* H. C. Evans, Stalpers, Samson & Benny [1], are among the most devastating diseases affecting cacao plantations. Yield losses are usually over 30%, but can reach 100% in some circumstances, leading to the total abandonment of cacao cultivation. WB caused a near collapse of cacao farming in Bahia state, Brazil. FPR is a quarantine disease in Brazil, and although it is still not reported in the country, there is a great risk of its spread into the cacao-producing areas of Brazil due to their proximity with countries in which the disease is present.

Both *M. perniciosa* and *M. roreri* (Phylum Basidiomycota; Order Agaricales; Class Agaricomycetes; Family Marasmiaceae) [1] are hemibiotrophic fungi with similar lifestyle and two distinct colonization phases. The biotrophic phase characterized by convoluted mycelium that colonizes the intercellular space, and the necrotrophic phase characterized by hyphae that invades the cells leading to internal and external necrosis and death of the infected tissues [2, 3], and fungal sporulation. Although these pathogens share some commonalities, there are differences that discriminate them.

Moniliophthora perniciosa is able to infect a variety of meristematic tissues: vegetative shoots, flower cushions, flowers and cacao pods. The most characteristic symptom of an infection with *M. perniciosa* is the hypertrophic growth of the infected vegetative meristem, shaped like a broom (hence the name) [4]. The infective propagule of *M. perniciosa* is a basidiospore produced in the lamellae of the basidiomata that emerge from the dead plant tissue [2]. On the other hand, *M. roreri* is pod specific [5], and the spores are produced on thick, felt-like pseudostroma, which are powdery when mature without the formation of basidiomata. The amount of spores produced by *M. roreri* combined with their longevity have largely contributed to its ability to invade new territories [6].

Moniliophthora roreri is only able to infect individuals of *Theobroma* and *Herrania*, two genera of the Malvaceae family. *Moniliophthora perniciosa* has a much wider range of plant hosts encompassing both plant species from the Malvaceae family and distantly related families, e.g. the Solanaceae family. Four biotypes, based on the pathogen ability to infect a particular plant species have been recognized [7]: biotype C is specific to the Malvaceae family, infecting the genera *Theobroma* and *Herrania*; biotypes S and L infect Solanaceae and many species of vines and lianas from the Malpighiaceae and Bignoniaceae families; and the biotype B which exclusively infects *Bixa orellana* (Bixaceae). Previous studies analyzed

the karyotype of *M. perniciosa* and assessed their diversity using molecular and biochemical markers, uncovering genetic similarity between biotypes C and S. High variation at chromosomal level and in microsatellite telomeric profiles among isolates of biotype C were observed [8]. Global population genetics analyses, using 11 microsatellite markers well-characterized *M. perniciosa* isolates from biotypes C and S, reported the existence of five host genetically distinct *M. perniciosa* subpopulations in Brazil [9]. These genetically differentiated host subpopulations have unique host associations and a high degree of both host and cultivar specificity [9, 10]. Isolates originating from cacao always cause infection in cacao plants, but not necessarily on a solanaceous host, whereas some solanaceous isolates, e.g., from Lobeira, proved to be nonpathogenic in cacao [9].

Fungal plant pathogens interact largely with their plant hosts via the secretion of effectors. Fungal effectors are small molecules associated with an organism that manipulate host cell physiological and morphological processes in the plant hosts. Thus facilitating infection (virulence factors or toxins) and/or provoking plant defenses (avirulence factors: Avr) [11]. Most of the identified eukaryotic pathogenic effectors do not contain domains or homologies to proteins with known function; therefore, their roles remain unclear. In general, fungal effectors are highly polymorphic, a characteristic attributed to their rapid adaptation to the host [12]. Most of these are rich in cysteine, from multigenic families and from specific lineage [13]. The *in silico* identification and functional characterization of these proteins will be the first step towards identifying the mechanisms of colonization by the different host subpopulations adding knowledge about the biology and modes of action of these host specific subpopulations.

Fungal genomes of isolates with specific adaptations (e.g., as a function of habitat and host) are expected to be molded according to the infection strategies employed by the pathogen in order to maximize the success for pathogenicity, i.e., its ability to provoke the infection. Therefore, the availability of genomic data from different isolates of the same pathogen is essential to uncover genomic variation intrinsic to the pathogenicity of certain species, subpopulation or fungal populations [14].

Whole-genome sequencing, determined by bioinformatics/statistical methods, has become a method of choice to perform genome-scans for candidate effectors across isolates and/or species, particularly in obligate biotrophs where functional approaches are impeded. The currently available *M. perniciosa* genome (isolate 553) [15], generated by a consortium of Brazilian Institutions (www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura), revealed that the pathogen contains a 26.66-Mb genome organized in 8 chromosomes with 13,560 predicted proteins [16].

The analysis allowed a general overview of the *M. pernicioso* genome highlighting important genes involved in stress adaptation, plant necrosis induction and genes associated with pathogenesis mechanisms [15]. Rincones et al. [17] carried out a comparative transcription analysis between biotrophic and saprophytic *M. pernicioso* phases found specific genes at each stage of its life cycle. For example, oxaloacetate acetyl hydrolase in the biotrophic phase, putative virulence genes (e.g., glucuronyl hydrolase; putative chitinase) and transposons (induced in the biotrophic phase) [2, 18]. A full genome of *M. roreri* from an isolate collected in Ecuador revealed a genome with 52.3 Mb and 17,910 predicted genes [4] that showed 93% similarity with genes encoding secreted proteins in *M. pernicioso*. Sequencing of more distinct isolates from *M. roreri* and *M. pernicioso* subpopulations will help to gain more information on the biology of these pathogens, contributing to the prevention of FPR in Brazil as well as to better understanding WB caused by isolates other than cacao.

In this context, comparative pathogenomics can be an important tool for understanding *Moniliophthora* infection strategies. With the availability of the reference genomes for *M. pernicioso* and *M. roreri*, we report genomes of six *Moniliophthora* isolates: i) two isolates of *M. pernicioso* that differ in pathogenicity level to cacao plants; ii) one *M. pernicioso* isolate from Ecuador; iii) two *M. pernicioso* isolates representative of the host subpopulations previously defined by Patrocínio et al. [9]; and iv) one *M. roreri* isolate representative from Peru (Bolivar group according to Phillips-Mora et al. [19]). The power and usefulness of these genome scans provides an important step to prioritize candidate effectors of interest for future studies.

Methods

Moniliophthora pernicioso and *M. roreri* isolates and DNA isolation

In the present work we used five *M. pernicioso* genomes; representative of previously described subpopulations within the Solanaceae (2) and of the Malvaceae (3) families [9, 20–22], and one *M. roreri* genome obtained from *Theobroma cacao* at the Instituto de Cultivos Tropicales (ICT), Peru.

Each isolate is specific of subpopulation: **Mp4145** (CEPLAC/CEPEC, Bahia, Brazil accession number 4145) and **Mp1441** (CEPLAC/CEPEC, Bahia, accession number 1441) isolated from a susceptible cacao genotype collected in 2003 and 2012, respectively, and represents two separate incursions of *M. pernicioso* in Bahia [20]. **Mp178** (CEPLAC/CEPEC, Bahia, accession number 4413) and **Mp4071** (CEPLAC/CEPEC, Bahia, accession number 4071) were derived from the wild solanaceous

hosts lobeira in Minas Gerais and Caçara in Bahia (both from Brazil); that do not infect cacao [21]. **Mp4124** (INIAP/Ecuador, accession number 404) is a representative isolate from *M. pernicioso* population's from Ecuador [22], and **MrPeru** (Peru/ICT, accession number 05) is a representative of one of the major groups of *M. roreri* (the Bolívar group) established by Phillips-Mora et al. [19] in a global diversity study. For simplicity, hereafter these are referred to as “isolates”.

Isolates from Bahia have been maintained as viable cultures in the *M. pernicioso* (CEPLAC/CEPEC/FITOMOL) culture collection (CEGEN N° 109/2013/SECEXGEN) in sterile distilled water [23] and in mineral oil. Foreign isolates from Ecuador and Peru were received as pure DNA.

The genomic DNAs were extracted from 2 g of mycelial fresh mass using the AxyPrep Multisource Genomic DNA Kit (AxyGen, CAT. N° AP-MN-MS-GDNA-50, Union City, CA, USA). DNA of *M. roreri* isolate was obtained from ICT, Peru. The concentration and quality of the DNA obtained were checked in Qubit and NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer (Therm Fisher Scientific) in 1% agarose gel. The identities of the isolates were validated using the highly conserved fungal rRNA gene primers (ITS1F and ITS4) as previously described [21, 24].

Data filtering, de novo assembly and mapping sequencing

Genomes of *M. pernicioso* and *M. roreri* (MrPeru) isolates were sequenced at the Center of Biotechnology and Genetics (CBG), UESC/Laboratory of Molecular Markers, in Bahia, Brazil using Illumina MiSeq® platform. The DNA was used to generate Illumina shotgun paired-end sequencing libraries prepared with the Nextera DNA Sample Preparation/Illumina® (CAT. N° FC-121-9009) following the manufacturer instructions and sequenced by Illumina MiSeq® reagents kit V3 600 cycles (Illumina®, CAT. N° 15,043,894). Libraries were validated and quantified with KAPA Library Quantification Kit Illumina® Platforms (KR0405 v6.14), in ABI Prism real-time PCR according to the manufacturer protocol. The PhiX, a standard of 10 Nm and 500 pb, was used to ensure absolute quantification of the libraries. The concentration and quality of the libraries were inferred by the dissociation curve analysis of the graph obtained after qPCR, wherein the presence of adapter dimers was also evaluated. The reads were filtered with the FastQC software. Repeat Masker v4.0.1 software [25] was used to identify repetitive elements. Quality and completeness of genome was evaluated using Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs Version 2 (BUSCO v2) based on a Basidiomycota ortholog dataset [26]. Prediction of genes was performed with the Augustus software v3.2.3 [27]. An annotation pipeline, MAKER2

[28], was used to choose the best possible gene model based on evidence alignments. The Mp4145 sequence is available at the UESC-CEPLAC restricted databases at <http://nbcgib.uesc.br/mperniciosa>.

Phylogenomics

The phylogeny of the isolates was reconstructed based on a concatenated alignment of 610 orthologs and multiple sequence alignments were performed with MUSCLE software v3.8.31 [29]. A maximum likelihood tree was obtained with RAxML v8.0.9 [30] using the GTRGAMMA model with 1000 bootstrap replicates. iTOL - Interactive Tree of Life v4 software [31] was used to display the best-rated ML tree. The MrPeru isolate (*M. roreri*) was used as an outgroup.

Identification of candidate secreted effector proteins

Secreted proteins were characterized as proteins containing a signal peptide. Signal peptides were identified using three softwares: SignalP 4.1 [32], Phobius [33] and PrediSi [34], with D-score = Y. Protein subcellular localizations were conducted using TargetP [35] Loc = S and SherLoc2 [36] softwares with “extracellular” addressing parameter. TMHMM v2.0 [37] and Phobius [33] softwares were used to keep proteins with one Transmembrane domain (TM) or without TM located on the N-terminal signal peptide. To increase the stringency, only predicted proteins selected by both softwares were considered for further analyses. After the secretome prediction, proteins with 5% or higher of undetermined amino acids (X) were removed (Fig. 1).

Further, based on Toro and Brachmann [38] effectors prediction pipeline, secreted proteins were mined for candidate secreted effector proteins (CSEPs) considering at least one of the following effector-oriented criteria: (i) nuclear localization signal (NLS) proteins using NLStradamos [39], (ii) small proteins (≤ 150 aa) rich in cysteine ($> 3\%$) (SCR), using a perl script, and (iii) repeats containing protein (RCP), with the XTREAM software [40]. To increase the likelihood of identifying effectors, CSEPs were also predicted by EffectorP software [41] (Additional file 1: Table S1; Fig. 1). Finally, we built a database of CSEPs. Proteins predicted by more than one criterion were counted only once.

Next, functional characterization of the CSEPs was carried out using BLAST2GO tool software [42]. The sequence similarity was obtained using the BLASTp algorithm against NCBI Non-Redundant Database (NR). The CSEPs annotation was performed using Gene Ontology (GO).

Results

De novo genome sequencing and phylogenomics

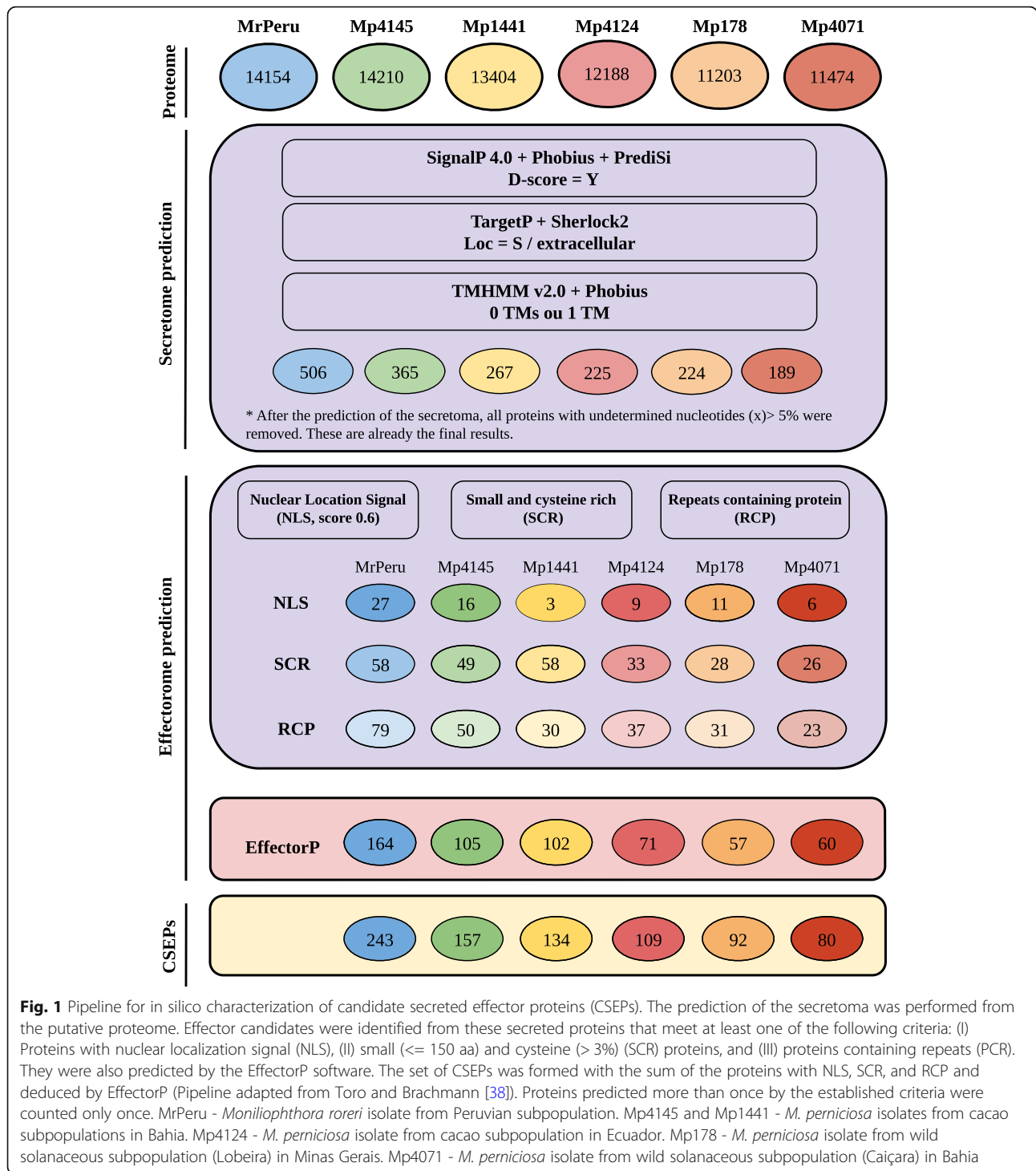
We selected two well characterized isolates from cacao, Mp4145 and MrPeru to build the *M. perniciosa* and *M.*

roreri genome sequences. The assembly resulted in genome sizes of approximately 45 Mb: 47.01 Mb in Mp4145, 46.36 Mb in Mp1441, and 45.47 Mb in Mp4124; 45.17 Mb in MrPeru, 44.42 Mb in Mp4071, and 43.92 Mb in Mp178. The genome assembly comprised an average of 2158.66 contigs with N50 average of 0.084 Mb among isolates, and the longest scaffold size of 0.91 Mb for the genome of *M. perniciosa* and 0.53 Mb of *M. roreri* (Table 1). The genome qualities varied among isolates, MrPeru showed the highest completeness with 95.9%, and Mp1441 the lowest (66%) from a total of 1335 BUSCO groups searched (Additional file 2: Table S2). The most abundant repetitive elements in all isolates were long terminal repeats (LTRs). In total, the repetitive elements corresponded to percentages smaller than 1.4% in all genomes (Additional file 3: Table S3). The genome annotation using MAKER2 software [28] allowed us to predict 14,154 (MrPeru), 14,210 (Mp4145), 13,404 (Mp1441), 12,188 (Mp4124), 11,203 (Mp178) and 11,474 (Mp4071) proteins in each genome (Table 1).

The phylogeny was reconstructed based on a concatenated alignment of genes. The phylogenetic tree indicated a division of the isolates into two major clades: a clade containing *M. perniciosa* isolates from Ecuador (Mp4124) and Bahia (Mp4145 and Mp1441), as well as the wild solanaceous (Mp4071) isolate from Bahia; and another clade with the wild solanaceous isolate from Minas Gerais (Mp178), all supported with high bootstrap values (Fig. 2). Surprisingly, isolates Mp4124 and Mp4071, which came from different subpopulations and hosts, were rescued as a sibling group, being sibling clade of Mp1441. Mp4145 constitutes a clade with the grouping Mp1441, Mp4071 and Mp4145.

Candidate secreted effector proteins

We combined multiple bioinformatic approaches to predict putative effectors within *M. perniciosa* and *M. roreri*, and those conserved across *Moniliophthora* species and isolates. Secreted proteins were accepted as candidate effectors if at least one of the following criteria was fulfilled: (i) nuclear localization signal (NLS), (ii) small proteins (≤ 150 aa) rich in cysteine ($> 3\%$) (SCR), and (iii) repeats containing protein (RCP) [38, 43, 44]. In addition, we also used a software that searches for effector candidates using machine learning, the EffectorP [40]. This pipeline is outlined in Fig. 1. Concisely, the secretome of each isolate was predicted from the putative proteome using a series of combined softwares. Proteins with signal peptide in the N-terminal region addressing secretion and not being retained in the transmembrane region were predicted as secreted proteins. To achieve that, the results obtained individually from each program were combined, and the common sequences among the analyses for each category were



selected as candidate secreted effector proteins (CSEPs). The predicted secretomes of the isolates were composed of 506 proteins from MrPeru, 365 from Mp4145, 267 from Mp1441, 225 from Mp4124, 224 from Mp178 and 189 from Mp4071.

Among the predicted effectors that contain NLS, 27 proteins were found in MrPeru, 16 in Mp4145, 3 in

Mp1441, 9 in Mp4124, 11 in Mp178 and 6 in Mp4071. Fifty-eight SCR effector proteins were identified in MrPeru, 49 in Mp4145, 58 in Mp1441, 33 in Mp4124, 28 in Mp178 and 26 in Mp4071. The prediction of RCP varied from 79 (MrPeru) to 23 (Mp4071) proteins. In total, the EffectorP predicted 164 effector candidates in MrPeru, 105 in Mp4145,

Table 1 Genetic features of genomes

	MrPeru	Mp4145	Mp1441	Mp4124	Mp178	Mp4071
Assembled genome size (Mb)	45.17	47.01	46.34	45.47	43.92	44.42
N50 scaffold size (Kb)	56	87	90	90	92	92
NumN50	226	141	137	133	126	128
Longest scaffold size (Kb)	530	910	910	910	910	910
Number of contigs	2994	2676	2100	1967	1526	1689
GC %	47.8	47.7	47.7	47.8	48	47.9
Proteome predicted	14,154	14,210	13,404	12,188	11,203	11,474

Comparison of the assembly statistics of Illumina sequencing of the genome of *Moniliophthora* spp. MrPeru - *Moniliophthora roreri* isolate from Peruvian subpopulation. Mp4145 and Mp1441 - *M. perniciosa* isolates from cacao subpopulations in Bahia. Mp4124 - *M. perniciosa* isolate from cacao subpopulation in Ecuador. Mp178 - *M. perniciosa* isolate from wild solanaceous subpopulation (Lobeira) in Minas Gerais. Mp4071 - *M. perniciosa* isolate from wild solanaceous subpopulation (Caiçara) in Bahia

102 in Mp1441, 71 in Mp4124, 57 in Mp178 and 60 in Mp4071 (Fig. 1).

In the final predicted CSEPs dataset, very few proteins were predicted with two of the three criteria considered for the prediction of effectors (NLS, SCR and RCP), and none of the proteins presented the three criteria. Mostly, putative effector candidates showed only one of these characteristics. EffectorP also found most of the CSEPs of SCR type. In addition, EffectorP also predicted CSEPs that were not present in any of the three criteria described above (Additional file 4: Figure S1). The total arsenal of CSEPs from all the isolates (effectorome) was obtained by taking all the sequences that obeyed the three criteria used in the pipeline (NLS, SCR and RCP) plus those predicted by EffectorP. The individual repertoire of predicted CSEPs were 243 for MrPeru, 157 for Mp4145, 134 for Mp1441, 109 for Mp4124, 92 for Mp178 and 80 for Mp4071 (Fig. 1). The effector lists are available in Additional file 5: Table S4, separated by category (NLS, SCR, RCP and those predicted by the EffectorP).

Functional characterization of CSEPs

The putative functional characterization of CSEPs performed with BLAST2GO were separated according to the biological processes, molecular function and cellular component in which they are involved (Fig. 3, Additional file 6: Table S5).

Biological processes

The identified CSEPs were separated according to the biological processes in which they are involved. In MrPeru, 56 proteins were related to biological processes, 43 in Mp4145, 33 in Mp1441, 20 in Mp4124, 18 in Mp178 and Mp4071. Among the biological processes, organic substance metabolic processes and primary metabolic processes showed a higher number of proteins with these functions in MrPeru, Mp4145, Mp1441, Mp4124 and Mp178. Mp4071 showed more proteins with functions in metabolic processes and cellular processes. Pathogenesis function, despite in smaller amounts, was found in Mp178 and Mp4124. Other biological processes have the function of establishment

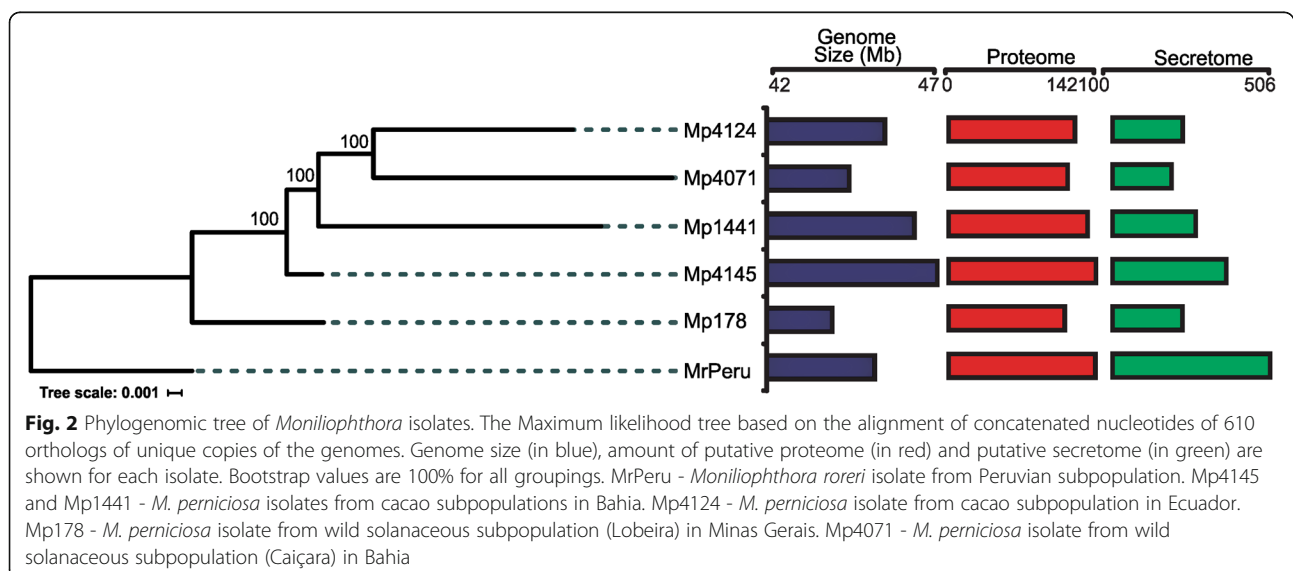


Fig. 2 Phylogenomic tree of *Moniliophthora* isolates. The Maximum likelihood tree based on the alignment of concatenated nucleotides of 610 orthologs of unique copies of the genomes. Genome size (in blue), amount of putative proteome (in red) and putative secretome (in green) are shown for each isolate. Bootstrap values are 100% for all groupings. MrPeru - *Moniliophthora roreri* isolate from Peruvian subpopulation. Mp4145 and Mp1441 - *M. perniciosa* isolates from cacao subpopulations in Bahia. Mp4124 - *M. perniciosa* isolate from cacao subpopulation in Ecuador. Mp178 - *M. perniciosa* isolate from wild solanaceous subpopulation (Lobeira) in Minas Gerais. Mp4071 - *M. perniciosa* isolate from wild solanaceous subpopulation (Caiçara) in Bahia

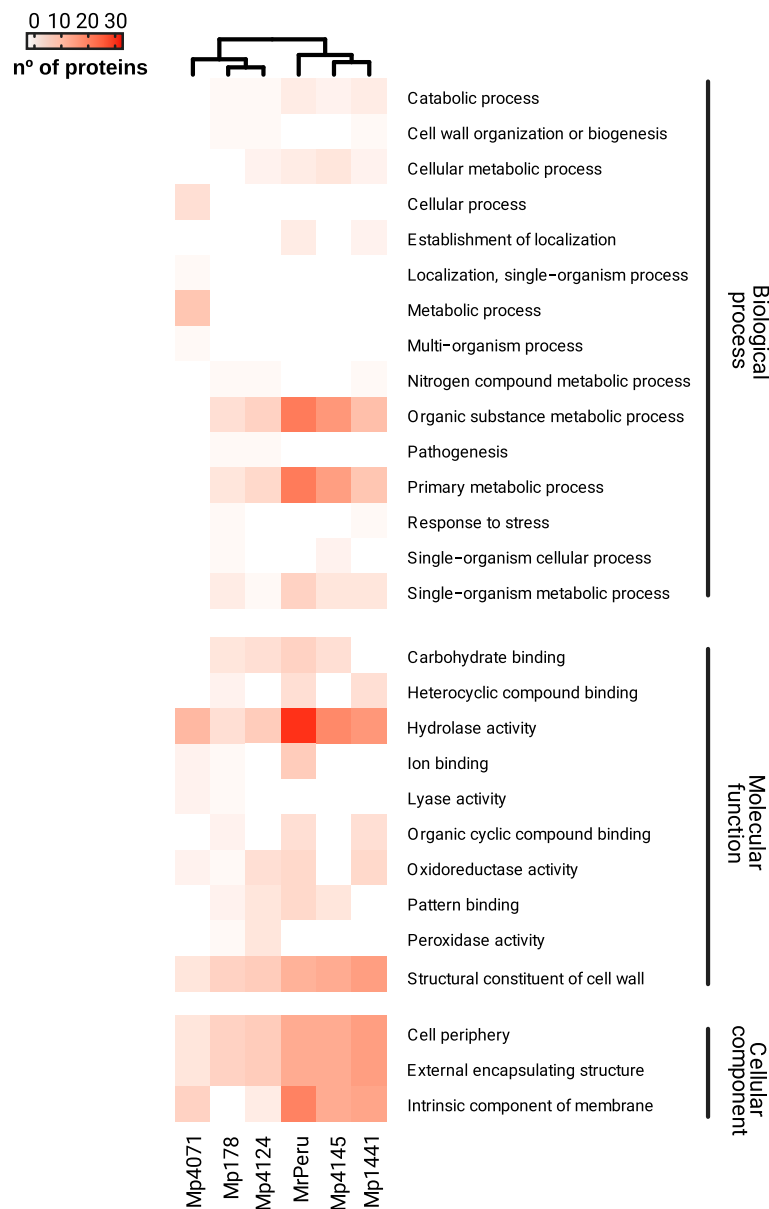


Fig. 3 Functional characterization hitmap of the CSEPs with the blast2GO results. The Functional characterization hitmap of the CSEPs with the blast2GO results used Level 3 Gene Ontology hierarchy for biological processes, molecular function and cellular component. MrPeru - *Moniliophthora roreri* isolate from Peruvian subpopulation. Mp4145 and Mp1441 - *M. perniciosa* isolates from cacao subpopulations in Bahia. Mp4124 - *M. perniciosa* isolate from cacao subpopulation in Ecuador. Mp178 - *M. perniciosa* isolate from wild solanaceous subpopulation (Lobeira) in Minas Gerais. Mp4071 - *M. perniciosa* isolate from wild solanaceous subpopulation (Caiçara) in Bahia

(MrPeru and Mp1441), cell wall organization or biogenesis (Mp1441, Mp4071 and Mp178) and response to stress (Mp1441 and Mp178), which may be related to the plant-pathogen interaction. A large number of families of glycoside hydrolases were found in all isolates. Endoglucanase II was also identified in four of the isolates (MrPeru, Mp4145, Mp4124 and Mp178), except for Mp1441 and Mp4071. Carbohydrate esterase families were detected in all isolates, except Mp178.

Molecular function

In general, 77 proteins were identified in MrPeru, 40 in Mp4145, 47 in Mp1441, 34 in Mp4124, 26 in Mp178 and 21 in Mp4071 related to molecular functions. Among them, hydrolase activity and structural constituent of cell wall were the most frequent and common to all isolates. In addition to hydrolase activity, other enzymes with lyase (in Mp178 and Mp4071), oxidoreductase (MrPeru, Mp1441, Mp4124, Mp178 and Mp4071) and peroxidase (Mp178 and Mp4124) activities were identified.

Cell component

In the cell component category, 45 proteins were identified in MrPeru, 39 in Mp4145, 44 in Mp1441, 19 in Mp4124, 14 in Mp178 and 15 in Mp4071. The three functions that stood out were cell periphery, external encapsulating structures and intrinsic components of membranes in all isolates. The latter function was not found in Mp178.

Core effectors

We used the OrthoVenn [45] to identify orthologous genome clusters among the CSEPs of the six isolates; the sequence similarity was calculated with e-value cut-off of 1e-25 and inflation value of 2.5. The Venn diagram represents orthologous clusters among the sequences. The diagram pointed out eight clusters shared among isolates (Fig. 4, Additional file 7: Table S6A), with a total of 49 CSEPs. Only two of the clusters showed functional annotation. Of the two annotated clusters, one presented cell component function acting in the extracellular region, and the other with GO for cellular component: actin cortical patch, endosome and plasma membrane; molecular function: calcium ion binding and biological process: endocytosis, with hit against the Swiss-Prot for Protein SnodProt1 and actin cytoskeleton-regulatory complex protein PAN1. These clusters were considered

as core effectors of the *Moniliophthora* genus, suggesting that conserved genes are involved in the pathogenicity of these fungi.

Exclusive effectors

We found four unique clusters in MrPeru with eight proteins, of which only one cluster was annotated, with homology to the cell wall protein DAN4 (Fig. 4, Additional file 7: Table S6B). The other isolates did not show exclusive clusters for each individual; however, there were exclusive clusters to a host subpopulation. Eight clusters were shared among cacao isolates (Mp4145, Mp1441 and Mp4124) with a total of 24 proteins, which showed two annotated clusters with homology against the Swiss-Prot database for fruiting body protein SC3 and fruiting body protein SC7. These proteins are structural constituent of the cell wall that operates in the extracellular region (Fig. 4, Additional file 7: Table S6C). Thirteen clusters were exclusive of the Bahian isolates from cacao host (Mp1441 and Mp4145), with homology for four of them: endoglucanase-1, hyphally regulated protein, fruiting body protein SC3 and pheromone-processing carboxypeptidase KEX1 (Fig. 4, Additional file 7: Table S6D). Two clusters were exclusive to the solanaceous isolates (Mp178 and Mp4071), one with homology to a hyphally regulated cell wall

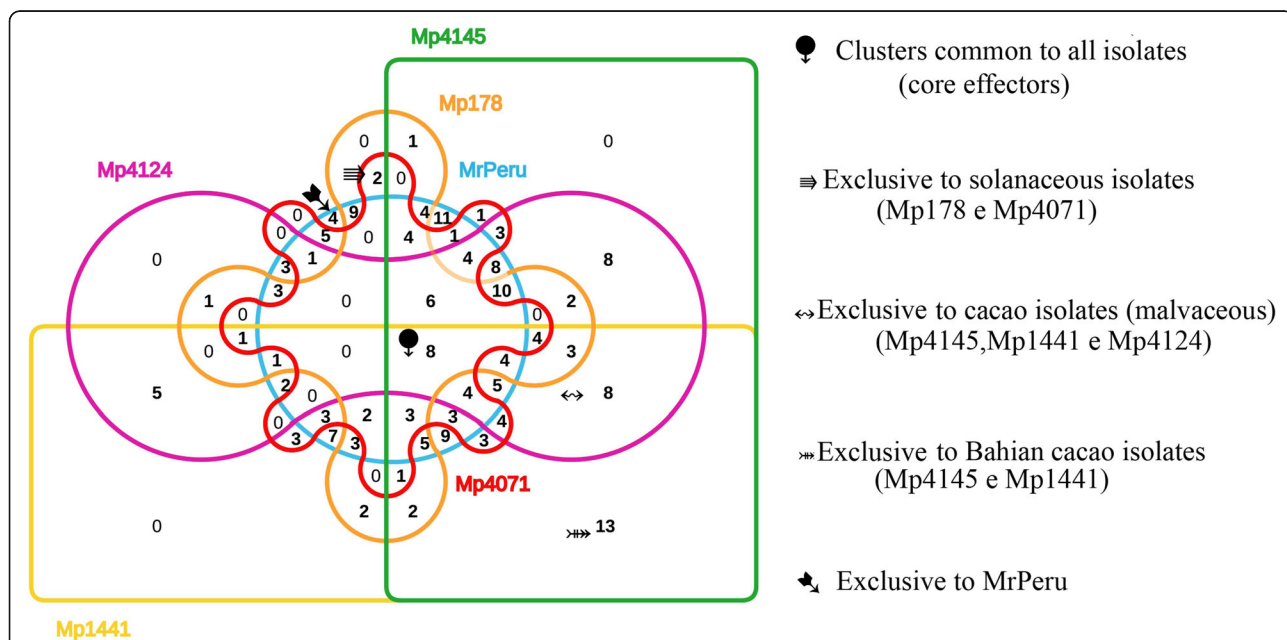


Fig. 4 Distribution and clustering of CSEPs repertoire among six *Moniliophthora* genomes. The number of proteins shared among isolates are indicated: eight clusters with 49 proteins were common to all isolates, four clusters were exclusive to MrPeru, eight clusters with a total of 24 proteins exclusives to cacao isolates (Mp4145, Mp1441 and Mp4124), two clusters with four proteins exclusive to solanaceous isolates (Mp178 and Mp4071). Thirteen clusters with 26 proteins were exclusive to Bahian isolates from cacao (Mp1441 and Mp4145). MrPeru - *Moniliophthora roreri* isolate from Peruvian subpopulation. Mp4145 and Mp1441- *M. perniciosa* isolates from cacao subpopulations in Bahia. Mp4124 - *M. perniciosa* isolate from cacao subpopulation in Ecuador. Mp178 - *M. perniciosa* isolate from wild solanaceous subpopulation (Lobeira) in Minas Gerais. Mp4071 - *M. perniciosa* isolate from wild solanaceous subpopulation (Caiçara) in Bahia

protein 3, with GO for cellular component: anchored component of membrane, cell surface, extracellular region and fungal-type cell wall; and biological processes involved with pathogenesis (Fig. 4, Additional file 7: Table S6E).

Sequences that were not clustered by OrthoVenn were grouped into singletons. One-hundred and three singletons were identified in MrPeru, 15 in Mp4145, 26 in Mp1441, 10 in Mp4124, 11 in Mp178 and 14 in Mp4071 sequences (Table 2). The list of singletons is available in Additional file 7: Table S6.

Discussion

Within the genus *Moniliophthora*, the main notorious plant pathogens are *M. perniciosa* and *M. roreri* because they are the causal agents of the most important diseases on cacao – the chocolate tree – in the Americas. The dissemination of these pathogens most likely spread alongside with the propagation of cacao cultivation. The release of the sequencing of the genomes of *M. perniciosa* [16] (genome size 26.66 Mb) and *M. roreri* [4] (genome size 52.3 Mb) plant pathogens along with the *T. cacao* genome, their host plant [46, 47], represent a significant milestone in the era of “genomics”.

Moniliophthora perniciosa can infect more than five species, both horticultural and wild solanaceas, which is a rather unusual feature for this fungus that is highly efficient to cause disease in cacao [21, 48]. In contrast, *M. roreri* is a highly specialized pathogen of cacao plants, infecting only pods. Within *M. roreri*, genetic diversity studies have indicated the occurrence of five genetically diverse groups [19]. The isolate used herein is from Peru, a representative of the Bolivar group, which comprises isolates from Peru, Colombia, Venezuela and Ecuador. In this work, we generated a assembly and annotation of the genome of *M. perniciosa* isolates/subpopulation that varies for pathogenicity to cacao genotypes, and a *M. roreri* isolate representative of one of the major *M. roreri* group.

Table 2 Summary OrthoVenn

	CSEPs	Clusters	Singletons
MrPeru	243	131	103
Mp4145	157	141	15
Mp1441	134	108	26
Mp4124	109	98	10
Mp178	92	81	11
Mp4071	80	66	14

Summary of OrthoVenn with total CSEPs, orthologous clusters (at least contains two species) and singletons. MrPeru - *Moniliophthora roreri* isolate from Peruvian subpopulation. Mp4145 and Mp1441 - *M. perniciosa* isolates from cacao subpopulations in Bahia. Mp4124 - *M. perniciosa* isolate from cacao subpopulation in Ecuador. Mp178 - *M. perniciosa* isolate from wild solanaceous subpopulation (Lobeira) in Minas Gerais. Mp4071 - *M. perniciosa* isolate from wild solanaceous subpopulation (Caçara) in Bahia

The genome sizes differ from those reported in literature [11, 16]. MrPeru was somewhat smaller (45.17 Mb) than the total genome of *M. roreri* described by Meinhardt et al. [11] who reported a size of 52.3 Mb. The genome sizes of *M. perniciosa* isolates was estimated to be higher, between 47.01 and 43.92 Mb, than that described by Mondego et al. [16]. These differences are expected, and presumably are attributable to the isolates used herein or to assembly strategies. Our results are supported with the profiles found in the species and in agreement with predicted number of genes, as well as in accordance with the results in other fungi. Although long-read sequencing in genomics platforms and/or RNAseq data could be used to further look deep into the genome, our data allowed gaining insight into the potential repertoire of small secreted proteins (effectors) of *M. perniciosa* and *M. roreri* pathogens.

Our assemblies of *M. perniciosa* and *M. roreri* isolates allowed us to identify phylogenetic relationships and CSEPs molecules of *Moniliophthora*, which are key for a successful host infection and pathogenic adaptation. This knowledge will be used to develop strategies aiming to limit the spread of WB and FPR. We used a conservative approach to predict the array of effectors, and so we believe we are presenting a representative set of CSEPs for these isolates.

Inferred phylogeny was consistent with the previous studies using *M. perniciosa* from Solanaceous and Malvaceous isolates, pointing to a common ancestor and sustained the relationship among host subpopulations [9]. Hence, these isolates are expected to share more homologues among them and show similar expansion or contraction of certain gene families.

On average, about 32% of the effectors found in the isolates showed to be small proteins rich in cysteine. Although mostly of the SCRs are related to apoplastic effectors, there are SCR effectors that can act on the cytoplasm as well such as the AvrP4 and AvrP123 effectors of *Melampsora lini* that are recognized by intracellular immune receptors [49]. GO analysis showed that most of the CSEPs are likely to respond to oxidative stress. These proteins may be secreted to counteract host generated oxidative stress.

CSEPs that are RCP corresponded on average to 30.5% of the effectorome of the isolates. This is important because some effectors are characterized by being in unstable regions in the genome, as in repeat-rich regions and centromeres, which may be fully connected with their high polymorphic potential. This high polymorphism that characterizes effectors can promote their evolution, an important factor for pathogen adaptation and avoidance of the plant immune system, thus allowing a successful infection process [43].

The first line of plant defense is the recognition of pathogen associated molecular pattern (PAMPs), thus activating plant immune system triggering effector-induced immunity (ETI) [50]. In this line, we found an abundance of proteins associated with cell periphery, external encapsulating structure, and intrinsic component of membrane and structural constituent of cell wall compounding an arsenal of proteins that may act as putative effectors that might limit the entry of microbes, restrict fungal colonization or kill pathogens within the host plant.

Functional characterization of the effector candidates is consistent with the results of Ferreira [51], who observed that the secreted protein profile of *M. perniciosa* of cacao and solanaceous hosts consists of an enzymatic arsenal, resulting in effector-triggered susceptibility (ETS). Among these enzymes we found a great amount of hydrolases [50]. Presence of hydrolases in the secretome of other pathogens has been associated with the degradation of polymers of the plant cell wall, allowing fungal penetration into host tissues, besides being a source of water and nutrients for them [50]. For ex, in *Aspergillus flavus* the production of extracellular hydrolases was linked to its survival on a variety of substrates and penetration into host tissues [52]. Also, Meinhardt et al. [4] analysis of *M. royeri* transcriptome revealed 11 differentially expressed glycoside hydrolases in the biotrophic phase of the *M. royeri*. We propose that these proteins, potentially, allow the pathogen to degrade plant compounds and initiate infection even in the presence of the high oxidative stress environment, but it is evident that additional study is required to test this hypothesis.

The overrepresented GO categories associated with biological processes were those related to energy metabolism, especially metabolism of compounds involved with carbohydrates. CSEPs were lipases, hydrophobins and necrosis-inducing endopolygalacturonases nature. These results suggested that *M. perniciosa* secretome consists of diverse proteins that function in an organized manner to suppress different aspects of fungal colonization for disease success [8]. Ferreira [51] also described this type of proteins in their work, and related them with important roles in several biological process, pathophysiological processes.

The determination of the core effectors, either to the genus or each subpopulation, suggests that these putative effectors are highly conserved and are essential proteins for pathogenicity, being non-specific for infection on the different hosts [38] and probably specific to these pathosystems. In contrast, the unique CSEPS of each species/subpopulation/isolate may be involved with the specificity with which they infect and how they infect each host.

Conclusion

The repertoire of plant pathogen effectors is key to understanding the plant-pathogen interaction and the co-evolution process of the pathosystem. The present work provided a database of the putative effectorome of *Monilophthora* isolates and species. Of further interests is the identified set of core effector conserved in all isolates. This is an important finding as it is expected to be related with the adaptation of different lineages to different hosts. Inevitably, this finding opens numerous new questions about the biology of these fungi. Thus, the current set of effectors found in *M. royeri* and *M. perniciosa* are valuable resources for future studies of effector function and evolution of these plant pathogens. In addition, they can be used as tools to search for cacao defense against these plant pathogens aiming to achieve plants with durable resistance.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Bioinformatics tools used to predict CSEPs. (DOCX 9 kb)

Additional file 2: Table S2. Assessment of genome quality by BUSCO. (DOCX 12 kb)

Additional file 3: Table S3. Repeat elements in the genomes. (DOCX 14 kb)

Additional file 4: Figure S1. Venn diagrams: comparison of results of the effectors: (I) Nuclear Location Signal (NLS), (II) small and cysteine rich (SCR), and (III) repeats containing protein (RCP) and effectors predicted by EffectorP. (DOCX 759 kb)

Additional file 5: Table S4. Lists of CSEPs. (XLSX 26 kb)

Additional file 6: Table S5. Annotation of the CSEPs. (XLSX 50 kb)

Additional file 7: Table S6. List of common and unique clusters and singletons. (XLSX 16 kb)

Abbreviations

BUSCO: Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs; CBG: Center of Biotechnology and Genetics; CSEPs: Candidate secreted effector proteins; ETI: Effector-triggered immunity; ETS: Effector-triggered susceptibility; FPR: Frosty pod rot; GO: Gene Ontology; ML: Maximum likelihood; Mp1441: *Monilophthora perniciosa*, from cacao, Bahian subpopulation (2003); Mp178: *Monilophthora perniciosa*, solanaceous hosts (wild solanaceous – Lobeira), from Minas Gerais; Mp4071: *Monilophthora perniciosa*, solanaceous hosts (wild solanaceous – Caiçara), from Bahia; Mp4124: *Monilophthora perniciosa*, from cacao, Ecuadorian subpopulation; Mp4145: *Monilophthora perniciosa* - from cacao, Bahian subpopulation (2012); MrPeru: *Monilophthora royeri*, from Peruvian subpopulation Peru; NLS: Nuclear localization signal; RCP: Repeats containing protein; SCR: Small and cysteine rich; TM: Transmembrane domain; WB: Witches' broom

Acknowledgements

This work was done in the frame of the International Consortium in Advanced Biology (CIBA; <https://www.ciba-network.org>). The authors thank the Molecular Plant Pathology Laboratory and the Plant Pathology Laboratory at INIAP personnel for their assistance in obtaining the DNAs, Dr Carmen Suarez Capello for her kind assistance in Ecuador, and the Núcleo de Biologia Computacional e Gestão de Informações Biotecnológicas - UESB (NBCGIB), and Copenhagen University for providing bioinformatics facility. Data sets were processed in sagarana HPC cluster, CPAD-ICB-UFMG. The authors would also like to thank Dr. Claudia Fortes Ferreira (Embrapa CNPMF, Brazil) and Dr. Raul Renné Valle (CEPLAC/CEPEC, Brazil) for English language revision. We are also grateful to Ivanna Michelle Meraz Pérez for helping

translating an early version of this manuscript and to the anonymous reviewers who provided helpful comments to our work. KPG, FM and CPP were supported by research fellowship Pq-1 from CNPq.

Funding

National Council for Scientific Development (CNPq) n° 311759/2014–9. CSB acknowledges FAPESB (Foundation for Research Support of the State of Bahia) for supporting her with a research assistantship during her Master's Programme.

Availability of data and materials

The data and materials supporting the conclusions of this article are also included within the article and its additional files. Data is archived in UESC-CEPLAC, BRAZIL restricted database at <http://nbcgib.uesc.br/mperniciosa>.

Authors' contributions

CSB and KPG responsible for designing the experiments and writing the manuscript. RRF coordination of bioinformatics analysis, bioinformatic analysis of the genome and revision of the manuscript. TMB bioinformatic and data analyses, sequence analysis, and reviewed the manuscript. MAB helped with DNA extraction. MAB and DOJA performed the biological experiments and sequencing of the libraries. CSA, GRF and EMA collaboration in the bioinformatics analysis and helped analyze the data. MRC biological samples obtention, isolation, growth, storage, and DNA extraction in Brazil. EAG collected samples and helped with DNA extraction in Peru. KSH collected of samples and extraction of DNA in Ecuador. CPP helped to conceive the experiments and sequencing of libraries, and writing of the manuscript. FM participated in its design and coordination of the Illumina sequencing and participated in critical revisions for important intellectual content. KPG coordination of the study, participated, helped with the biological samples collection and advised CSB. All authors have read and approved the manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Isolates used in this study were from *M. perniciosa* culture collection of CEPLAC/CEPEC/FITOMOL, Itabuna, Bahia, Brazil. CGEN Authorization N° 109/2013/SECEXCGEN (Process 02000.001362/2013–76).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as potential competing interest.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Departamento de Ciências Biológicas (DCB), Centro de Biotecnologia e Genética (CBG), Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, Ilhéus 45662-900, Bahia, Brazil. ²Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), Centro de Pesquisas do Cacao (CEPEC), Seção de Fitossanidade (SEFIT), Laboratório de Fitopatologia Molecular (FITOMOL), km 22 Rod. Ilhéus Itabuna, Ilhéus 45600-970, Bahia, Brazil. ³The Bioinformatics Centre, Department of Biology, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark. ⁴CIMAR/CIIMAR, Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Universidade do Porto, Porto, Portugal. ⁵Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais/Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ⁶Instituto de Cultivos Tropicales – ICT, Tarapoto, Peru. ⁷Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias – INIAP, Departamento de Protección Vegetal, Quito, Ecuador. ⁸CIIRAD, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France.

Received: 2 March 2018 Accepted: 18 June 2018

Published online: 03 July 2018

References

1. Aime MC, Phillips-Mora W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*. 2005;97:1012–22.
2. Meinhardt LW, Rincones J, Bailey BA, Aime MC, Griffith GW, Zhang D, et al. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: What's new from this old foe? *Mol Plant Pathol*. 2008;9:577–88.
3. Phillips-Mora W, Coutinho A, Ortiz CF, López AP, Hernández J, Aime MC. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. *Plant Pathol*. 2006;55:584.
4. Meinhardt LW, Costa GGL, Thomazella DPT, Teixeira PJPL, Carazzolle MF, Schuster SC, et al. Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. *BMC Genomics*. 2014;15:164.
5. Bailey BA, Evans HC, Phillips-Mora W, Ali SS, Meinhardt LW. *Moniliophthora roreri*, causal agent of cacao frosty pod rot. *Mol Plant Pathol*. 2018; <https://doi.org/10.1111/mpp.12648>.
6. Griffith GW, Nicholson J, Nenninger A, Birch RN, Hedger JN. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *New Zeal J Bot*. 2003;41:423–35.
7. Griffith GW, Hedger JN. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis perniciosa*. *Heredity (Edinb)*. 1994;72:278–89.
8. Rincones J, Mazotti GD, Griffith GW, Pomela A, Figueira A, Leal GA, et al. Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis perniciosa* from various plant hosts in South America. *Mycol Res*. 2006;110:821–32.
9. Patrocínio NGRB. Genética e evolução de *Moniliophthora perniciosa* de hospedeiros solanáceos e malváceos. Universidade Estadual de Santa Cruz, Brazil. *Genet Mol Biol*. 2016;
10. Gramacho KP, Newman Luz EDM, Da Silva FS, Lopes UV, Pires JL, Pereira L. Pathogenic variability of *Moniliophthora perniciosa* in three agroecological zones of the cacao region of Bahia, Brazil. *Crop Breed Appl Biotechnol*. 2016;16:7–13.
11. Dalio RJ, Magalhães DM, Atilio LB, Rodrigues CM, Breton MC, Pichi S, Pascholati SF, Machado MA. Efeitos nas Interações Planta-patógeno. *Revisao Anu Patol Plantas*. 2014:1–44.
12. Ellis JG, Rafiqi M, Gan P, Chakrabarti A, Dodds PN. Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Curr Opin Plant Biol*. 2009;12:399–405.
13. Hacquard S, Joly DL, Lin Y-C, Tisserant E, Feau N, Delaruelle C, et al. A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust). *Mol Plant-Microbe Interact*. 2012;25:279–93.
14. Park J, Zhang Y, Buboltz AM, Zhang X, Schuster SC, Ahuja U, et al. Comparative genomics of the classical *Bordetella* subspecies: the evolution and exchange of virulence-associated diversity amongst closely related pathogens. *BMC Genomics*. 2012;13:1–17.
15. Mondego JMC, Carazzolle MF, Costa GGL, Formighieri EF, Parizzi LP, Rincones J, et al. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into witches' broom disease of cacao. *BMC Genomics*. 2008;9:548.
16. Mondego JM, Carazzolle MF, Costa GG, Formighieri EF, Parizzi LP, Rincones J, et al. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into witches' broom disease of cacao. *BMC Genomics*. 2008;9:548.
17. Rincones J, Scarpari LM, Carazzolle MF, Mondego JMC, Formighieri EF, Barau JG, et al. Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the witches' broom pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2008;21:891–908.
18. Micheli F, Guitinan M, Gramacho KP, Wilkinson MJ, Figueira VDO, Maximova S, Delseny M. Functional genomics of cacao. *Adv Bot Res*. 2010;55:119–77.
19. Phillips-Mora W, Aime MC, Wilkinson MJ. Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathol*. 2007;56:911–22.
20. Jucá Santos FF, Vanderlei Lopes U, Pires JL, Pires Melo GR, Peres Gramacho K, Clément D. QTLs detection under natural infection of *Moniliophthora perniciosa* in a cacao F₂ progeny with scavina-6 descendants. *Agrotrópica (Itabuna)*. 2014;26:65–72.

21. Patrocínio NGRB, Ceresini PC, Gomes LIS, Resende MLV, Mizubuti ESG, Gramacho KP. Population structure and migration of the witches' broom pathogen *Monilophthora perniciosa* from cacao and cultivated and wild solanaceous hosts in southeastern Brazil. *Plant Pathol.* 2017;66:900–11.
22. H KS, Gramacho KP, Lopes UV. Genetic Diversity of *Monilophthora perniciosa* Populations from Cocoa in Ecuador. 2005. p. 85–99. CFC Technical Paper N 55.
23. Castellani A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *J trop Med Hyg.* 1967;70:181–4.
24. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *PCR Protoc.* 1990:315–22.
25. Tarailo-Graovac M, Chen N. Using RepeatMasker to identify repetitive elements in genomic sequences. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2009:1–14.
26. Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva EV, Zdobnov EM. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics.* 2015;31:3210–2.
27. Stanke M, Keller O, Gunduz I, Hayes A, Waack S, Morgenstern B. AUGUSTUS: a b initio prediction of alternative transcripts. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:435–9.
28. Cantarel BL, Korf I, Robb SMC, Parra G, Ross E, Moore B, et al. MAKER: an easy-to-use annotation pipeline designed for emerging model organism genomes. *Genome Res.* 2008;18:188–96.
29. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:1792–7.
30. Stamatakis A. RAXML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 2014;30:1312–3.
31. Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:W242–5.
32. Petersen TN, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods.* 2011;8:785–6.
33. Kääll L, Krogh A, Sonnhammer ELL. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:429–32.
34. Hiller K, Grote A, Scheer M, Münch R, Jahn D. PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:375–9.
35. Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, Von Heijne G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol.* 2000;300:1005–16.
36. Briesemeister S, Blum T, Brady S, Lam Y, Kohlbacher O, Shatkay H. SherLoc2: a high-accuracy hybrid method for predicting subcellular localization of proteins. *J Proteome Res.* 2009;8:5363–6.
37. Krogh A, Larsson B, Von Heijne G, Sonnhammer ELL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol.* 2001;305:567–80.
38. Toro KD, Brachmann A. The effector candidate repertoire of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. *BMC Genomics.* 2016;17:101.
39. Nguyen Ba AN, Pogoutse A, Provart N, Moses AM. NLStradamus: a simple hidden Markov model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinform.* 2009;10:1–11.
40. Newman AM, Cooper JB. XSTREAM: A practical algorithm for identification and architecture modeling of tandem repeats in protein sequences. *BMC Bioinform.* 2007;8:1–19.
41. Sperschneider J, Gardiner DM, Dodds PN, Tini F, Covarelli L, Singh KB, et al. EffectorP: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *New Phytol.* 2016;210:743–61.
42. Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics.* 2005;21:3674–6.
43. Saunders DGO, Win J, Cano LM, Szabo LJ, Kamoun S, Raffaele S. Using hierarchical clustering of secreted protein families to classify and rank candidate effectors of rust fungi. *PLoS One.* 2012;7:e29847.
44. Kamoun S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu Rev Phytopathol.* 2006;44:41–60.
45. Wang Y, Coleman-Derr D, Chen G, Gu YQ. OrthoVenn: a web server for genome wide comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:W78–84.
46. Argout X, Salse J, Aury JM, Guiltinan MJ, Droc G, Gouzy J, et al. The genome of *Theobroma cacao*. *Nat Genet.* 2011;43:101–8.
47. Motamayor JC, Mockaitis K, Schmutz J, Haiminen N, Livingstone D, Cornejo O, et al. The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. *Genome Biol.* 2013;14:r53.
48. Lopes JRM, Luz EDMN, Bezerra JL. Suscetibilidade do cupuaçuzeiro e outras espécies vegetais a isolados de *crinipellis perniciosa* obtidos de quatro hospedeiros diferentes no sul da Bahia. 2001;26:601–5.
49. Sperschneider J, Dodds PN, Gardiner DM, Manners JM, Singh KB, Taylor JM. Advances and challenges in computational prediction of effectors from plant pathogenic fungi. *PLoS Pathog.* 2015;11:1–7.
50. Hématy K, Cherk C, Somerville S. Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol.* 2009;12:406–13.
51. Ferreira RDM. Componentes epidemiológicos e perfil de proteínas secretadas de isolados de *Monilophthora perniciosa* de cacaueteiro e hospedeiros solanáceos. Ilheus: Universidade Estadual de Santa Cruz, Brazil; 2016. p. 99. http://nbcgib.uesc.br/genetica/admin/images/files/rafaella_ferreira.pdf.
52. Mellon JE, Cotty PJ, Dowd MK. *Aspergillus flavus* hydrolases: their roles in pathogenesis and substrate utilization. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;77:497–504.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://www.biomedcentral.com/submissions)



4. Conclusões

Este trabalho reporta:

-A montagem e anotação do genoma de seis isolados representativos das diversas subpopulações do gênero *Moniliophthora* sendo: i) dois isolados de *M. perniciosa* do cacaueteiro, que diferem em virulência/agressividade ao cacaueteiro na Bahia, e um isolado de *M. perniciosa* do Equador, iii) dois isolados representativos de subpopulações de *M. perniciosa* em hospedeiros solanáceos, definidas por Patrocínio et al. (2017) e iv) um isolado representante de *M. roreri* do Peru (grupo Bolívar segundo Phillips-Mora et al. (2007).

-Uma listagem do repertório de proteínas secretadas candidatas a efetores;

-Identificação das proteínas secretadas candidatas a efetores comuns entre todos os isolados de *Moniliophthora* deste estudo e comuns entre subpopulações de *M. perniciosa*; e aquelas exclusivas a cada subpopulação.

-A presença de oito proteínas secretadas candidatas a efetores conservados (core effectors) foram identificados entre todas as subpopulações/espécies deste estudo. Esse conjunto de efetores putativos, altamente conservados, pressupõe ser fundamental para a interação planta-patógeno, portanto tem maior interesse para a caracterização funcional em trabalhos futuros.

-Além desses, quatro clusters de efetores putativos foram encontrados exclusivos a *M. roreri* (MrPeru), oito exclusivos as subpopulações de *M. perniciosa* do biótipo C (Mp4145, Mp1441 e Mp4124), treze ao biótipos C da Bahia (Mp4145 e Mp1441) e dois ao biótipo S (Mp178 e Mp4071), considerando esses, possíveis candidatos a efetores específicos do patossistema envolvido.

O repertório de proteínas secretadas candidatas a efetores listados nesse trabalho é um primeiro passo para a compreensão do patossistema dessas duas doenças devastadoras do cacaueteiro, a VBC e a MC. Para prosseguir nesse entendimento, as perspectivas futuras são caracterizar funcionalmente esses candidatos a efetores, preditos computacionalmente, nesses isolados, tendo os *core effectors* como prioridade, seguidos por proteínas secretadas candidatas a efetores exclusivos das subpopulações/espécies. Bem como viabilizar novos estudos na área, como a adaptabilidade (seleção positiva) e o interatoma dos efetores putativos com as proteínas R dos hospedeiros.

5. Referências Complementares

- AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v. 97, n. 5, p. 1012–1022, 2005.
- ALBUQUERQUE, P.S.B. et al. Doenças do cacauero (*Theobroma cacao*). Em: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A; Camargo, L.E.A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. v. 2 (4ta Ed.), p. 151-163. Livroceres, Piracicaba, 2005.
- ALVIM, F. C. **Análise da influência das fontes de carbono na patogenicidade do *Moniliophthora perniciosa* em *Theobroma cacao***. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2009.
- ANDRADE, M. P. Ilhéus: Passado e Presente. 2. ed. **Ilhéus: Editus**, 2003
- BAILEY, B. A. et al. Differential gene expression by *Moniliophthora roreri* while overcoming cacao tolerance in the field. **Molecular Plant Pathology**, v. 15, n. 7, p. 711–729, 2014.
- BASTOS, C. N. Patogenicidade e características do isolado de *Crinipellis perniciosa* procedente de Uruçuca, Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 344-346. 1990
- BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology**, v. 34, n. 2, p. 306–312, 1985.
- BIRCH, P. R. J. et al. Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 8–11, 2006.
- CALLE, H. et al. Histology of witches' broom caused in cacao by *Crinipellis perniciosa*. **Cytology and Histology**. 1982.
- CIFERRI, R. E.; PARODI, E. Descrizione del che causa la "MONILIASI" DEL CACAO. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 6, p. 539–542, 1933.
- DALIO, R. J. D. et al. Efeitos nas Interações Planta-patógeno. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, p. 1–44, 2014a.
- DALIO, R. J. D. et al. Phosphite protects *Fagus sylvatica* seedlings towards phytophthora plurivora via local toxicity, priming and facilitation of pathogen recognition. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014b.

- DALIO, R. J. D.; OSSWALD, W. Deciphering mechanisms of pathogenicity and resistance induction in the interaction between *Phytophthora* spp. and European beech (*Fagus sylvatica* L.). **Fachgebiet für Pathologie der Waldbäume**, v. Dr. rer. n, p. 188, 2013.
- DE ARRUDA, M. C. C. et al. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis pernicioso* from different geographic origins and hosts. **Mycological research**, v. 107, n. Pt 1, p. 25–37, 2003.
- EVANS, H. C. Frosty Pod Rot (*Moniliophthora roreri*). [s.l.] **Springer International Publishing**, Switzerland, 2016.
- EVANS, H. C. et al. Of mushrooms and chocolate trees: Aetiology and phylogeny of witches' broom and frosty pod diseases of cacao. **Plant Pathology**, v. 62, n. 4, p. 728–740, 2013.
- EVANS, H. C. et al. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. **Plant Pathology**, v. 52, n. 4, p. 476–485, 2003.
- EVANS, H. C. et al. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. **Canadian Journal of Botany**, v. 56, n. 20, p. 2528–2532, 1978.
- EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, n. 3, p. 515–523, 1980.
- EVANS, H. C. Witches' broom disease of cocoa *Crinipellis pernicioso* in Ecuador. **Annals of Applied Biology**, v. 89, n. 2, p. 185–192, 1978.
- FUNDACIÓN HONDUREÑA DE INVESTIGACIÓN AGRÍCOLA. **La Moniliasis Del Cacao: Un enemigo a vencer**. [s.l.: s.n.].
- GRIFFITH, G. W. et al. Witches' brooms and frosty pods: Two major pathogens of cacao. **New Zealand Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p. 423–435, 2003.
- GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicioso*. **Heredity**, v. 72, n. 3, p. 278–289, 1994a.
- GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. Spatial distribution of mycelia of the liana (L-) biotype of the agaric *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer in tropical forest. **New Phytologist**, v. 127, n. 1, p. 243–259, 1994b.

- HENDERSON, J. S. et al. Chemical and archaeological evidence for the earliest cacao beverages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 48, p. 18937–18940, 2007.
- HOGENHOUT, S. A. et al. Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, n. 2, p. 115–122, 2009.
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). **Protocolo estandarizado de oferta tecnológica para el cultivo del cacao en el Perú** / IICA. Lima, Perú. 73 p. 2006.
- JOHNSON, J. M. et al. Manual De Manejo Y Produccion Del Cacaotero. p. 40, 2008.
- KAMOUN, S. A Catalogue of the Effector Secretome of Plant Pathogenic Oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, n. 1, p. 41–60, 2006.
- KAMOUN, S. Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, n. 4, p. 358–365, 2007.
- KAMOUN, S. The Secretome of Plant-Associated Fungi and Oomycetes. **Plant Relationships, 2nd Edition**, n. Dawkins 1999, p. 1–8, 2009.
- MADDISON, A. C. et al. Cocoa production in Ecuador in relation to dry-season escape from pod rot caused by *Crinipellis perniciosa* and *Moniliophthora roreri*. **Plant Pathology**, v. 44, n. 6, p. 982–998, 1995.
- MAG/IICA. **Identificación de mercados y tecnología para productos agrícolas tradicionales de exportación**. Quito, Ecuador. 2001.
- MARTINS, P. T. A. Os reflexos da crise da lavoura cacaueira nos ecossistemas de manguezal nos ecossistemas de manguezal do município de Ilhéus, Bahia. **Geografia**, v. 16, n. 1-**Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Geociências**, p. 39–50, 2007.
- MEINHARDT, L. W. et al. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: What's new from this old foe? **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 5, p. 577–588, 2008.
- MEINHARDT, L. W. et al. Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: Mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, 2014.
- MONDEGO, J. M. C. et al. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. **BMC Genomics**, v. 9, 2008.

- NAVARRO, M.; MENDOZA, I. Cultivo del Cacao en Sistemas Agroforestales. **Historia**, p. 67, 2006.
- NIELLA, G. R. et al. Aperfeiçoamento da metodologia de produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n. 4,v. 24, p. 523 – 527,1999.
- PARK, J. **Phylogenomic variations and host adaptations of the classical Bordetellae**. [s.l.] Pennsylvania State University, 2013.
- PATROCÍNIO, N. G. R. B. **Análise comparativa entre os biótipos C e S de *Moniliophthora pernicioso* na Bahia por morfometria, patogenicidade e análise multilocos**. [s.l.] Universidade Estadual de Santa Cruz, 2011.
- PATROCÍNIO, N. G. R. B. **Genética e evolução de *Moniliophthora pernicioso* de hospedeiros solanáceos e malváceos**. [s.l.] Universidade Estadual de Santa Cruz, 2016.
- PATROCÍNIO, N. G. R. B. et al. Population structure and migration of the witches' broom pathogen *Moniliophthora pernicioso* from cacao and cultivated and wild solanaceous hosts in southeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, n. 6, p. 900–911, 2017.
- PEREIRA, J.L et al. Primeira ocorrência vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacao do Brasil. **Agrotropica**, v. 1, p. 79-81,1989.
- PHILLIPS-MORA, W. et al. Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. **Plant Pathology**, v. 56, n. 6, p. 911–922, 2007.
- PIRES J. L., CASCARDO J. C. M., LAMBERT S. V., Figueira A. Cacao germoplasm characterization based on fat content. **International Workshop on Cocoa Breeding Strategies**. Kuala Lumpur, Malaysia, 1995.
- PIROVANI, C. P. **Identificação e caracterização de proteínas expressas no espaço intercelular de folhas de *Theobroma cacao* na interação com *Moniliophthora pernicioso***. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2008.
- PORTO, B. N. **Sequenciamento do genoma e identificação de candidatos a efetores de *Hemileia vastatrix***. [s.l.] Universidade Federal de Lavras, 2016.
- RINCONES, J. et al. Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* from various plant hosts in South America. **Mycological Research**, v. 110, n. 7, p. 821–832, 2006.

- SAUNDERS, D. G. O. et al. Using hierarchical clustering of secreted protein families to classify and rank candidate effectors of rust fungi. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.
- SÁNCHEZ-MORA, F.; GARCÉS-FIALLOS, F. Moniliophthora roreri (Cif y Par) Evans et al . en el cultivo de cacao Moniliophthora roreri (Cif y Par) Evans et al . in the crop of cocoa. **Scientia Agropecuaria**, v. 3, n. August, p. 249–258, 2012.
- SCHAFER, W. Molecular Mechanisms of Fungal Pathogenicity to Plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, n. 1, p. 461–477, 1994.
- SHAN, L. et al. **Hide-and-Seek: Dynamic Co-evolution in Plant-Bacterium Warfare**. v. 49, n. 1, p. 105–111, 2007.
- SILVA, S. D. V. M. et al. **Redescrição da sintomatologia causada por *Crinipellis pernicioso* em cacauero**. v. 14, n. 1, p. 2003, 2002.
- SONAH, H. et al. Computational Prediction of Effector Proteins in Fungi: Opportunities and Challenges. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. February, p. 1–14, 2016.
- SONG, J. et al. Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 5, p. 1654–1659, 2009.
- SPERSCHNEIDER, J. et al. Advances and Challenges in Computational Prediction of Effectors from Plant Pathogenic Fungi. **PLoS pathogens**, v. 11, p. 1–7, 2015.
- SPERSCHNEIDER, J. et al. EffectorP: Predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. **New Phytologist**, v. 210, n. 2, p. 743–761, 2016.
- TEIXEIRA, P. J. P. L. et al. The Fungal Pathogen *Moniliophthora pernicioso* Has Genes Similar to Plant PR-1 That Are Highly Expressed during Its Interaction with Cacao. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–10, 2012.
- TEIXEIRA, P. J. P. L. et al. Time for Chocolate: Current Understanding and New Perspectives on Cacao Witches' Broom Disease Research. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 10, p. 1–8, 2015.
- TREVIZAN, S. D. P.; MARQUES, M. Impactos sócio-econômicos da crise do cacau: um estudo de comunidade-caso. **Agrotrópica**, v. 14, p.127-136, 2002.
- WENT, F. A. F. C. Krulloten en versteende vruchten van de cacao in Suriname. **Verhandelingen Der Koninklijke Akademie van Wetenschappen**, Amsterdam, v. 2, p. 40, 1904.
- WOOD, G.A.R.; LASS, R.A. Cacao. **Londres: Blackwell Science**. 4. ed, 1985.