UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

PRÓ REITORIA DE PÓS GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO MICÉLIO E SECRETOMA DE *Moniliophthora perniciosa* CRESCIDO EM DUAS FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO

AMANDA GABRIELLY SANTANA SILVA

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL

NOVEMBRO DE 2022

AMANDA GABRIELLY SANTANA SILVA

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO MICÉLIO E SECRETOMA DE *Moniliophthora perniciosa* CRESCIDO EM DUAS ALTERNATIVAS DE CARBONO

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 Molecular e de Microrganismos.

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL

NOVEMBRO DE 2022

AMANDA GABRIELLY SANTANA SILVA

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO MICÉLIO E SECRETOMA DE *Moniliophthora perniciosa* CRESCIDO EM DUAS ALTERNATIVAS DE CARBONO

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 Molecular e de Microrganismos.

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa
(UESC)

Drª. Ariana Silva Santos
(PNPD/CAPES)

Dr.ª Dahyana Santos Britto
(Mars Center for Cocoa Science)

Prof.ª Dr.ª Fátima Cerqueira Alvim
(UESC – Orientadora)

Dedicatória

Para a pessoa que se dedicou a mim no momento da vida em que me encontrei mais vulnerável. Por ter sido tão visionária a ponto de enxergar a cura e a alegria onde eu só via desesperança. Gratidão por tanto amor! Á minha tia, amiga e mãe, que não me gerou no útero, mas sim em seu coração, DEDICO.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu Deus que nunca me desamparou em todos os momentos da minha vida. Tenho imensa gratidão por ele ter me auxiliado a chegar até aqui, atendendo as minhas súplicas e orações.

Agradecer aos meus ancestrais em especial a minha bisavó Maria Assis de Santana (*in memoriam*), pelo exemplo de força e fé que me passou até a minha juventude. No auge dos seus 105 anos, ainda nos ensinava que tudo é possível aquele que crê!

Agradeço aos meus avós e padrinhos Luiz Antônio de Santana e Lenice Nogueira de Santana *(in memoriam*) por todo carinho, amor, educação e valores que me transmitiram ao longo dos seus dias, me considerando como uma filha, a quem sempre quiseram muito bem. Em especial, agradeço a minha avó por sempre ter me incentivado a estudar, por ter acreditado no meu potencial e por sempre me dizer que eu tinha que conseguir a minha independência através dos estudos. Essas palavras com certeza me ajudaram a chegar até aqui e superar todos os obstáculos!

Com muito amor, carinho e saudades, agradecer ao meu pai, Anselmo José Costa da Silva (*in memoriam*) que em seu pouco tempo de vida, me proporcionou tantos aprendizados, me ensinando que eu deveria me tornar amiga dos livros e ter amor pelo conhecimento. Mesmo tão pequena, sempre me motivou a conhecer histórias de grandes personalidades pra que eu pudesse me inspirar. Obrigada por tudo pai!

Em especial, agradeço a minha família Paulo Roberto, Renata Suely Nogueira de Santana, Paulo Roberto Filho e os meus irmãos, Luís Anselmo, Déborah Bahia, Kheila de Paula e Anderson de Jesus (*in memoriam*). Obrigada por tanta dedicação, amor e carinho por mim. Sou muito grata a Deus por fazer parte dessa família. Em especial a minha tia, por todo apoio e força que me deu nos últimos anos e ao meu primo Paulinho pelas conversas, brincadeiras, risos e tantos momentos de felicidade ao seu lado. Amo vocês!

Agradeço a Edy, Paula e Família por todo apoio, carinho e consideração! Sou imensamente grata por todo amor que vocês têm me dedicado.

Agradeço a toda Família Santana e Araújo Barros por toda dedicação e amor para comigo!

Agradeço por todo amor, conversas e companheirismo dos amigos Val, Luciana, Karla, Luciano e Bento! Obrigada por ter tentado me ajudar e me alegrar sempre que passava por alguma dificuldade! Sou muito grata!

Um agradecimento especial a Taís Araújo e Leticia Maróstica, pelo pouco tempo de convivência que nós tivemos, mas que foi o suficiente para muitas trocas profissionais e pessoais tão positivas. Levarei vocês comigo pra sempre!

Agradeço por todos os amigos que tem acompanhado a minha trajetória até aqui! Obrigada por sempre trazerem à tona os nossos encontros, alegrias e os momentos de apoio mútuo! Sem amigos, seria impossível levar a vida de maneira leve e tranquila.

Sou grata também pelos amigos que fiz no mestrado, pelas experiências de vida que ouvi e compartilhei, pelos encontros fora da universidadeepor todo momento de troca. Levarei vocês em meu coração!

Agradeço a toda equipe do laboratório de proteômica em especial a Monalisa, Maria Luiza, Matheus e Yuliana, que estavam sempre disponíveis para compartilhar o que sabiam e me auxiliar no que fosse preciso.

Agradeço a Prof.ª Dr.ª Fátima Alvim, por compreender alguns momentos em que precisei faltar como orientanda e aluna, agradeço também por toda a sua contribuição e dedicação profissional nesse trabalho que foi um desafio para nós duas devido a pandemia de covid-19. Também agradeço aos meus co-orientadores, Prof. Dr. Eric Aguiar e o Prof. Dr. Carlos Priminho por toda dedicação para que esse trabalho pudesse dar certo.

Por fim, agradeço a CAPES pela concessão da bolsa, a toda a estrutura da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) e ao Centro de Biotecnologia e Genética (CBG). Sem todos esses pilares, seria impossível chegar até aqui.

Epígrafe

Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante.

Charles Chaplin

ÍNDICE

RESUMO vii
ABSTRACT ix
1 - INTRODUÇÃO 1
2 - REVISÃO DE LITERATURA 2
2.1 - A cultura do cacau e a sua importância 3
2.2 - A Vassoura-de-Bruxa e o cacaueiro 7
2.3 – As fontes alternativas de carbono e o crescimento dos fungos 13
2.4 - A Proteômica 16
2.5 - A importância da proteômica de secretoma e micélio nos estudos de envolvendo fitopatógenos 19
2.6- Bioinformática, proteômica e identificação de proteínas em bancos de dados 21
3 - MATERIAL E MÉTODOS 23
3.1 - Preparo do meio de cultura, seleção da linhagem e condições de crescimento do fungo 23
3.2 – Extração de proteínas 25
3.2.1 – Extração de proteínas do micélio tratado com Glicose e Glicerol 25
3.2.2 – Extração de proteínas do secretoma de Glicose e Glicerol 27
3.3 - Quantificação de proteínas totais 28
3.4 - Eletroforese em SDS-PAGE 28
3.5 - Espectrometria de massas 28
3.6 – Identificação dos peptídeos em bancos de proteína 30
3.7 - Identificação de proteínas diferencialmente abundantes 31
3.8 - Validação Biológica 31
4.0- RESULTADOS 33
4.1 - Validação Biológica 33
4.1.1 - Avaliação da atividade do secretoma com 15 dias de crescimento, injetado nas folhas 34
4.1.2 - Avaliação da atividade com secretoma com 60 dias de crescimento, injetado nas folhas 35
4.2 - Crescimento dos fungos 36
4.3 – Qualificação da extração de proteínas do micélio e secretoma 38
4.4 – Identificação de proteínas do micélio e secretoma de *M. perniciosa* 39
4.5 - Identificação de proteínas diferencialmente abundantes 41
4.6 - Nível diferencial de abundância das proteínas 53
5.0 - DISCUSSÃO 56
6.0 - CONCLUSÃO 60
7.0- REFERÊNCIAS 61

RESUMO

SILVA, Amanda Gabrielly Santana, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Novembro de 2022. **Identificação de proteínas do micélio e secretoma de *Moniliophthora perniciosa* crescido em duas alternativas de carbono**. Orientadora: Fátima Cerqueira Alvim. Co-Orientador: Eric Roberto Guimarães Rocha Aguiar. Co-Orientador: Carlos Priminho Pirovani.

O *Theobroma cacao* é uma c*ommodity* agrícola de grande importância econômica, cultural e social para milhares de pessoas no mundo A cacauicultura produz matéria prima para diversos subprodutos, sendo o chocolate, mundialmente conhecido. Nos últimos anos, pesquisadores buscam alternativas de controle das doenças que acometem a cultura, visando melhorar a produtividade e a qualidade das amêndoas. Uma das principais causas no declínio da produção de cacau é a doença conhecida como vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* principalmente na região sul da Bahia, Brasil. Atualmente, parte das estratégias de controle de patógenos vem sendo desenvolvidas a partir da identificação de mecanismos desencadeados pelo fungo no hospedeiro. Nesse sentido, análises proteômicas do micélio e secretoma do fungo *M. perniciosa*, aliadas ao uso de ferramentas de bioinformática, auxiliam na identificação de proteínas que podem estar associadas a patogenicidade. O objetivo desse trabalho, foi verificar se o uso de fontes alternativas de carbono (glicose e glicerol), contribuem com a patogenicidade de *M. perniciosa*, através da expressão de proteínas de micélio e secretadas pelo fungo no crescimento *in vitro*. Para tanto, *M. perniciosa* foi crescido *in vitro* em meio de cultura contendo duas fontes diferentes de carbono (glicose e glicerol). As proteínas de micélio e as secretadas (secretoma) foram extraídas do meio de cultura utilizando um protocolo desnaturante. O perfil proteico foi revelado, através da separação de proteínas em gel SDS- PAGE, e as amostras foram analisadas via espectrometria de massas, e identificadas através da comparação com o banco de dados de *Moniliophthora roreri*. Foi realizada validação da atividade biológica do secretoma, mediante sua infiltração em folhas de *Nicotiana benthamiana*. Os resultados revelaram que há diferença no crescimento micelial de *M. perniciosa* a depender da fonte de carbono, sendo que, a presença de glicerol no meio, impacta negativamente o crescimento micelial, em comparação com o meio contendo glicose. A validação da atividade biológica revelou que o secretoma de glicerol é mais agressivo, pois induziu necrose no tecido foliar antes do secretoma de glicose. O perfil proteico resultou de

1.136 proteínas identificadas no micélio crescido na presença de glicose, 273 no micélio crescido na presença de glicerol, 697 no secretoma com glicose, e 534 no secretoma com glicerol. Dentre essas, a proteína *killer kp4*, foi identificada no secretoma de glicose, e a *PR-1*, no secretoma de glicerol, sendo a última, muito bem descrita por outros autores, como uma proteína relacionada com a patogenicidade. Além de proteínas especificas, também foi possível encontrar um grupo de proteínas envolvidas em diversos mecanismos celulares que influenciam na patogenicidade. Portanto, é possível afirmar que as estratégias de defesa do fungo desenvolvidas em seus micélios, foi mais visível no micélio em glicerol, onde verificou-se maior atividade de DNA/RNA. A validação biológica provou que o secretoma do fungo nas duas fontes de carbono, é patogênico, e pode causar dano aos tecidos foliares, porém, demonstrou-se mais agressivo na presença de glicerol

Palavras-Chave: Cacau; Vassoura-de-bruxa; Proteômica; Patogenicidade;

ABSTRACT

SILVA, Amanda Gabrielly Santana, M.S., Santa Cruz State University, Ilhéus, November, 2022. **Identification of proteins from the mycelium and secretome of *Moniliophthora perniciosa* grown on two carbon alternatives**. Advisor: Fátima Cerqueira Alvim. Co-Advisor: Eric Roberto Guimarães Rocha Aguiar. Co-Advisor: Carlos Priminho Pirovani.

Theobroma cacao is an agricultural commodity of great economic, cultural and social importance for thousands of people around the world. In recent years, researchers have been looking for alternatives to control the diseases that affect the crop, in order to improve the productivity and quality of almonds. One of the main causes of the decline in cocoa production is the disease known as witches' broom, caused by the fungus *Moniliophthora perniciosa*, mainly in the southern region of Bahia, Brazil. Currently, part of the pathogen control strategies has been developed from the identification of mechanisms triggered by the fungus in the host. In this sense, proteomic analyzes of the mycelium and secretome of the fungus *M. perniciosa*, combined with the use of bioinformatics tools, help in the identification of proteins that may be associated with pathogenicity. The aim of this work was to verify whether the use of alternative carbon sources (glucose and glycerol) contribute to the pathogenicity of *M. perniciosa*, through the expression of mycelial proteins and those secreted by the fungus during in vitro growth. Therefore, *M. perniciosa* was grown in vitro in a culture medium containing two different carbon sources (glucose and glycerol). Mycelial and secreted (secretome) proteins were extracted from the culture medium using a denaturing protocol. The protein profile was revealed, through the separation of proteins in SDS-PAGE gel, and the samples were analyzed via mass spectrometry, and identified through comparison with the *Moniliophthora roreri* database. Validation of the biological activity of the secretome was carried out, through its infiltration in *Nicotiana benthamiana* leaves. The results revealed that there is a difference in the mycelial growth of *M. perniciosa* depending on the carbon source, and the presence of glycerol in the medium negatively impacts the mycelial growth, compared to the medium containing glucose. Validation of the biological activity revealed that the glycerol secretome is more aggressive, as it induced necrosis in the leaf tissue before the glucose secretome. The protein profile resulted from 1,136 proteins identified in the mycelium grown in the presence of glucose, 273 in the mycelium grown in the presence of glycerol, 697 in the secretome with glucose, and 534 in the secretome with glycerol. Among these, the kp4 killer protein was

identified in the glucose secretome, and PR-1 in the glycerol secretome, the latter being very well described by other authors as a protein related to pathogenicity. In addition to specific proteins, it was also possible to find a group of proteins involved in several cellular mechanisms that influence pathogenicity. Therefore, it is possible to state that the defense strategies of the fungus developed in its mycelia were more visible in the mycelium in glycerol, where there was greater DNA/RNA activity. Biological validation proved that the fungus secretome in both carbon sources is pathogenic and can cause damage to leaf tissues, however, it was more aggressive in the presence of glycerol

Key words: Cocoa; Witch's broom; Proteomics; Pathogenicity;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Sistema agroflorestal para o cultivo de cacau, mais conhecido como cabruca. Fonte: <https://yam.com.vc/alimentacao/800686/o-cacau-que-transforma-vidas>, 2019. Acesso em 15 de agosto de 2022..... 4

Figura 2- Distribuição nacional entre área colhida e a produção de cacau. Na imagem A - área colhida em hectares (ha) e na imagem B - produção de cacau em toneladas (t). Dados relacionados a safra de em 2020 de Brainer, 2021 (adaptado).....5

Figura 3 – Representação esquemática do ciclo de vida do fungo *M. perniciosa* em *T. cacao* na fase biotrófica e necrotrófica (Teixeira; Thomazella; Pereira, 2015).....9

Figura 4 – Ramos do cacaueiro infectados com o fungo *M. perniciosa*. A- Fase biotrófica da infecção, onde há o engrossamento do broto vegetativo que é chamado comumente de vassoura verde. B- Super brotamento e proliferação desordenada dos ramos na fase biotrófica (CEPLAC, 2017). C- Fase necrotrófica, onde é possível notar o surgimento de cogumelos, os basidiósporos (EMBRAPA, 2015) (Imagens adaptadas).....10

Figura 5– Sintomas e Sinais de Vassoura de bruxa no fruto de cacaueiro. A - Frutos em formato de morango ou cenoura (CEPLAC, 2017). B - Frutos já desenvolvidos acometidos pela infecção, passam por amarelecimento precoce, que progride para manchas escuras e depressões no fruto. Fonte: <https://www.agrolink.com.br/problemas/vassoura-de-bruxa_1625.html>. C – A infecção por *M. perniciosa* danifica o cacau, inviabilizando a polpa e as sementes. Fonte: < https://biblioteca.incaper.es.gov.br/>. D – Os cogumelos também podem surgir no fruto, indicando a necrose nos tecidos, fazendo com que o ciclo de vida seja reiniciado. Fonte: < https://www.agrolink.com.br/problemas/vassoura-de-bruxa_3046.html>. (Imagens adaptadas).....11

Figura 6 - Publicações de estudos do banco de dados *PubMed* utilizando tecnologias Ômicas do período de 1998 a 2018 (Monti et al., 2019).....17

Figura 7- Espectrômetro de massas do Laboratório de Proteômica, situado no Centro de Biotecnologia e Genética da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC).....19

Figura 8 – Micélios crescendo no meio de cultura sólido, em BOD. A- Micélio de *M. perniciosa* crescido em meio de cultura mineral sólido, visto a olho nu. B – Micélio crescido em meio de cultura sólido, visto em estereomicroscópio Leica EZ4 D.....24

Figura 9 - Magentas sendo preparadas em capela de fluxo laminar, com 50mL de meio de cultura líquido, onde os discos do fungo *M. perniciosa* foram colocados iniciando o crescimento.....25

Figura 10 - Magentas preparadas para serem colocadas em BOD (Demanda Biológica de Oxigênio) para crescimento do fungo *M. perniciosa*. A – Magentas devidamente vedadas para crescimento controlado. B – Representação da BOD do laboratório de Biologia Molecular do CBG/UESC da marca SOLAB.....25

Figura 11 - Preparo das amostras miceliais de glicose e glicerol, para a extração de proteínas. A – *Pool* das amostras de micélio crescido em glicose (GLU) e glicerol (GLY), utilizando 3 réplicas biológicas. B – Preparo do ambiente e de material para dar início a extração dos micélios através do protocolo de Pirovani (2009), com modificações.....26

Figura 12 - Secretomas de glicose e glicerol em tubos *Falcon*. Foi realizado um *pool* dos secretomas de glicose (GLU) e glicerol (GLY), utilizando as 3 réplicas biológicas. Essas amostras foram utilizadas para a extração de proteínas, com o protocolo de Alvim (2009) com modificações.....27

Figura 13 - A e B – Espectrômetro de massas do tipo quadrupolo/Tempo-de-Voo (*Agilent* 6545 LC/QTOF) do laboratório de proteômica do CBG/UESC.....29

Figura 14 - Amostras de proteínas de micélio crescido em glicerol e glicose em ambos os secretomas, sendo injetadas no espectrômetro de massas.....30

Figura 15 - Infiltração do secretoma de *M. perniciosa* nas folhas de *Nicotiana benthamiana* para a validação biológica.....32

Figura 16 - Plantas de *Nicotiana benthamiana* utilizadas no experimento, aclimatadas em casa de vegetação do CBG/UESC.....33

Figura 17 – Folhas de *Nicotiana tabacum* após a infiltração do secretoma de *M. perniciosa*. Setas indicam infiltração do secretoma no espaço intercelular do limbo foliar.....34

Figura 18 – Secretoma de *M. perniciosa* crescidos em meio contendo glicose ou glicerol (15 dias) que foram infiltrados no limbo foliar da folha e induziu necrose em folhas de *N. benthamiana*. Folhas representativas de 24h (A), 48h (B) e 72h (C) após infiltração do secretoma. Controle foram as folhas infiltradas apenas com o meio de cultura.....35

Figura 19 – Folhas de *N. benthamiana* infiltradas secretoma de *M. perniciosa* crescidos em meio contendo glicose ou glicerol (60 dias), mostrando a indução de necrose no limbo. Folhas representativas de 24h (A), 48h (B) e 72h (C) após infiltração do secretoma. Controle foram as folhas infiltradas apenas com o meio de cultura.....36

Figura 20 - Glicose e glicerol induzem um aspecto diferencial em micélios de *Moniliophthora perniciosa*. A- Micélio de *M. perniciosa* crescido por 15 dias na presença de glicose. B – Micélio de *M. perniciosa* crescido por 15 dias na presença de glicerol.....37

Figura 21 - *M. perniciosa* crescido em diferentes fontes de carbono: Glicose (A) e Glicerol (B) em um período de 15 dias em crescimento controlado.....37

Figura 22 - Glicose (**GLU**) e Glicerol (**GLY**) utilizam de maneira diferente o meio de cultura em diferentes fontes de carbono. O primeiro tubo Falcon (**GLY**), representando o secretoma de glicerol contendo 37mL de meio e o segundo tubo Falcon (**GLU**), representando o secretoma glicose contendo 27mL de meio. A foto representa o crescimento do meio durante 15 dias.....38

Figura 23 – Perfil eletroforético das proteínas miceliais e secretadas de M. perniciosa. M- Marcador de peso molecular de 97 e 14KDa. Proteínas miceliais de M. perniciosa crescido em meio contendo glicose (**Micélio – Ose**) ou glicerol (**Micélio - Ol**) e secretadas do fungo crescido por 15 dias (**15D - Ose.; 15D Ol**) ou 60 dias em meio contendo glicose (**60D - Ose**) ou glicerol

(**60 D - Ol**) foram separadas em gel SDS-PAGE 12,5%.....39

Figura 24 – Representação das proteínas identificadas na análise de proteínas diferencialmente expressas, onde cada cor indica o quantitativo de proteínas segundo sua função em cada tratamento (Micélios com crescimento de 15 dias e Secretomas com crescimentos de 60 dias).....41

Figura 25 - *Volcano plot*, comparando cada tratamento, conforme as proteínas de significância (representadas na parte superior do gráfico em azul e vermelho). A – Comparação do micélio glicose com micélio glicerol. B – Comparação do secretoma de glicose, com secretoma de glicerol. Os pontos em cinza indicam as proteínas que não possuíram significância estatística para este trabalho.....42

Figura 26 - Diagrama de *Venn* demonstrando a quantidade de proteínas que foram exclusivas de cada tratamento e na intersecção, a quantidade de proteínas presentes nos dois tratamentos. A- Micélio Glicose x Micélio Glicerol. B- Secretoma Glicose x Secretoma Glicerol.....43

Figura 27 – *Heat Map*, representando o nível de abundância das proteínas diferenciais em cada tratamento considerando um *p-value*<0,05 e um *fold-change*≥1,5. Em vermelho, indicando abundância (*up*) e em azul, indicando ausência (*down*). A parte superior corresponde ao Micélio com Glicerol, e a parte inferior, Micélio com Glicose.....54

Figura 28 - *Heat Map*, representando o nível de abundância das proteínas diferenciais em cada tratamento considerando um *p-value*<0,05 e um *fold-change*≥1,5. Em vermelho, indicando abundância (*up*) e em azul, indicando ausência (*down*). A parte superior corresponde ao Secretoma com Glicerol, e a parte inferior, Secretoma com Glicose.....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proteínas diferencialmente abundantes no Micélio de Glicose e no Micélio de Glicerol, quanto ao nome, espectro, ID de acesso no Banco UniProt, abundância em cada fonte de carbono, abundância relativa, número de peptídeos únicos, cobertura, ponto isoelétrico e massa.....44

Tabela 2 - Proteínas diferencialmente abundantes no Secretoma de Glicose e Secretoma de Glicerol, quanto ao nome, espectro, ID de acesso no Banco UniProt, abundância em cada fonte de carbono, abundância relativa, número de peptídeos únicos, cobertura, ponto isoelétrico e massa.....50

SIGLAS E ABREVIATURAS

AVR – Gene de Avirulência

BOD – Demanda Biológica de Oxigênio

BSA - Albumina de Soro Bovina

CAOBISCO - Associação Francesa de Chocolate, Biscoitos e Confeitaria

CBG – Centro de Biotecnologia e Genética

CCR - Repressão do catabólito de carbono

CEPLAC -Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira

ECA – Associação Europeia do Cacau

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ETI – Imunidade Desencadeada por Efetores

FAOSTAT - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FCC – Federação do Comércio de Cacau

FDR – Taxa de Falso Positivo

GFP – Proteína Verde Fluorescente

GLU - Glicose

GLY- Glicerol

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICCO – Organização Internacional do Cacau

KDa – Kilo Dalton

mL – Mililitros

MPP ADR – Formato de Arquivo extraído do Espectrômetro de Massas

OL – Glicerol

Ose - Glicose

PAMPS – Padrões Moleculares Associados ao Patógeno

PR1 – Proteína Relacionada a Patogênese 1

PTI – Imunidade Desencadeada Pelo Patógeno

PUBMED – Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos

PVP - Polivinilpirrolidona

QTOF – Quadrupolo / Tempo de voo

R – Genes de Resistência a patógenos

RNA – Ácido Ribonucleico

RPM – Rotação por Minuto

SDS - Sulfato Dodecyl de Sódio

SDS PAGE – Eletroforese em gel de Poliacrilamida

SnRNA – Pequenas moléculas de RNA nucleolares

TCA – Acido Tricloroacético

UESC – Universidade Estadual de Santa Cruz

UNIPROT – Base de Dados Universal de Proteínas

μg – Microgramas

μL - Microlitros

1 - INTRODUÇÃO

Moniliophthora perniciosa (Stahel) Aime & Phillips-Mora é o agente causal da vassoura-de-bruxa do cacau (*Theobroma cacao* L.). A doença causada por esse fungo, é uma grande ameaça para a indústria multibilionária de produção e comercialização de chocolate, visto que o cacau é a principal matéria prima do qual se origina esse produto (Teixeira; Thomazella;Pereira, 2015).

A vassoura-de-bruxa, é uma das principais doenças que acometem o cacaueiro, sendo responsável por severas perdas de produtividade em países produtores de cacau nas américas (Marelli *et al*., 2019). A intensa produção de brotos nas árvores causa uma debilitação geral na cultura e após um certo período, é possível notar a podridão dos frutos, sendo esta considerada a principal causa de perdas nas colheitas (Purdy & Schmidt, 1996). Esse fungo é considerado hemibiotrófico incomum, com uma fase biotrófica longa e peculiar, onde ocorrem alterações significativas na morfologia e fisiologia do hospedeiro (Teixeira et al., 2015; Costa et al., 2021).

No ciclo de vida hemibiotrófico, os esporos em germinação desenvolvem-se como micélios monocarióticos para colonizar intracelularmente os tecidos vivos. Após algumas semanas, as hifas do patógeno tornam-se dicarióticas, formando uma curta conexão de hifas entre as células adjacentes, o que possibilita o estado dicariótico das células fúngicas, enquanto os tecidos do cacau se tornam necróticos e o fungo passa a se alimentar do tecido morto, entrando em sua fase necrotrófica (Sena et al., 2014; Costa et al., 2021).

Esse ciclo de vida peculiar é alvo de pesquisas para compreender a relação fungo e hospedeiro, com o objetivo de mitigar os danos causados por *M. perniciosa*. Para isso, algumas tecnologias ômicas tem sido amplamente utilizadas como é o caso da Proteômica. Essa técnica busca entender por exemplo, a relação das proteínas envolvidas no desenvolvimento de *M. perniciosa* sob o seu hospedeiro (De Andrade Silva, 2020).

As análises envolvendo estudos proteômicos no âmbito dos fungos fitopatogênicos que acometem doenças a grandes culturas têm sido utilizadas para identificar proteínas através de estudo de secretoma, ou do organismo através do micélio, de modo a identificar maneiras pelas quais os fungos utilizam a maquinaria celular do hospedeiro, para completar o ciclo de infecção (Simkovich; Kohalmi; Wang, 2022). Através desses estudos, torna-se possível a identificação de proteínas que interferem diretamente nos tecidos e funcionalidade da planta durante a infecção, tornando-se mais fácil a produção de pesticidas sintéticos que possam agir

diretamente em uma proteína, garantindo a diminuição dos efeitos da praga sob a planta, minimizando as interferências do patógeno de maneira objetiva e eficaz sem muitos danos aos tecidos e produtos extraídos da cultura (Peng, 2021).

A proteômica quantitativa baseada em espectrometria de massas é essencial para compreender as mudanças globais na abundância de proteínas e como a diversidade de modificações pós-traducionais de proteínas contribuem para as respostas das plantas aos patógenos (Elmore; Griffin; Walley, 2021). Uma das respostas da planta durante a interferência do patógeno, é a alteração da oferta nutricional (Evans; Prior, 1987; Frias et al., 1991). Neste cenário, o fungo consegue se readaptar as mudanças de fontes de carbono, ativando uma via alternativa de degradação de açúcar diferente da via da glicose (Klein; Swinnen; Thevelein; Nevoigt, 2017). Esse processo, é especialmente importante para o estabelecimento dos patógenos oportunistas, sob o indivíduo afetado (Brock, 2009; Fleck et al., 2011).

Neste contexto, a proteômica torna-se uma técnica fundamental para a identificação de proteínas nessas amostras altamente complexas, gerando materiais altamente descritivos, bem como informações sobre modificações pós traducionais que contribuem para a elaboração de dados funcionais, quantitativos e qualitativos (Monti et al., 2019). Esses dados contribuem para que haja uma comparação da expressão proteicas de cada meio, permitindo o entendimento dos mecanismos de adaptação do fungo, bem como, o reconhecimento de proteínas que possam contribuir com a patogenicidade, como foi realizado no trabalho de Alvim et al., (2009).

O objetivo geral deste trabalho, foi identificar se o uso de fontes de carbono alternativas (glicose e glicerol), contribuem com a patogenicidade de *M. perniciosa*, através da expressão de proteínas de micélio e secretadas pelo fungo no seu crescimento *in vitro*. Os objetivos específicos concentraram- se em i) Perfil proteico do micélio e secretoma, ii) Analisar se a fonte de carbono interfere na atividade biológica do que é secretado pelo fungo, iii) Verificar se na presença de glicerol existe uma maior quantidade de proteínas que induzem a patogenicidade.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - A cultura do cacau e a sua importância

O *Theobroma cacao* (cacaueiro) é uma espécie frutífera, originária da bacia amazônica (Wood; Lass, 1985; Motamayor et al., 2002). Tornou-se uma das culturas mais cultivadas em várias regiões dos trópicos úmidos, tornando-se uma *commodity* agrícola economicamente essencial para o sustento de milhões de pessoas em todo o mundo (Organização Internacional do Cacau, 2017).

O cacaueiro é diplóide, possui genoma relativamente pequeno e organizado em dez cromossomos (da Silva et al., 2017), contendo em torno de 682 famílias gênicas e aproximadamente 28.798 genes codificadores (Argout et al., 2011). Essas famílias gênicas estão relacionadas a vários fatores determinantes na cultura, como a resistência a doenças (Osório-Guarín et al., 2020), biossíntese de lipídios (Zhang; Maximova; Guiltinan, 2015), via biossintética de flavonóides (Cai et al., 2013) e síntese de terpenóides (Argout et al., 2011; Wickramasuriya; Dunwell, 2018).

Pertencente à família Malvaceae, o gênero Theobroma (Wood; Lass, 1985) possui mais de 20 espécies catalogadas, porém, *T. cacao* é a única espécie cultivada de maneira expressiva no mundo (Wood; Lass, 1985; Díaz- Valderrama; Leiva- Espinoza; Aime MC., 2020). O cacaueiro possui 10 grandes grupos genéticos (Motamayor et al., 2008; Osório-Guarín, 2020), porém, apenas 3 grupos são mais conhecidos e cultivados por conta das suas características agronômicas atenderem a especificidade do mercado. Esses 3 grupos são o *Criollo* (*T. cacao* Spp. *Criollo*), *Forasteiro* (*T. cacao* Spp. *Sphaerocarpum*) e *Trinitario*, sendo este último, originário do cruzamento entre *Criollo* e *Forasteiro* (Wickramasuriya; Dunwell, 2018).

O cacau *Criollo* é bastante conhecido por fornecer matéria-prima de excelente qualidade para a produção de chocolates nobres, sendo altamente aromático com sabores finos e de tom avermelhado (Ziegleder, 1990; Aprotosoaie; Luca; Miron, 2016). No entanto, o aumento da suscetibilidade da cultura a pragas e doenças, o baixo potencial agrícola e questões ligadas a produtividade, tornaram essa variedade menos popular entre os produtores de cacau (Ziegleder, 1990; Aprotosoaie; Luca; Miron, 2016).

Atualmente, a maior parte da produção mundial de chocolate (aproximadamente 80%) vem do cacau do tipo *Forastero*, pois esta variedade possui natureza resistente a doenças, alto rendimento, além produzir amêndoas relativamente mais que os do tipo *Criollo* (Rusconi;

Conti, 2010). O terceiro grupo genético, *Trinitario*, é um híbrido produzido a partir de cruzamentos entre as variedades *Criollo* e *Forastero* e hoje é cultivado em muitas partes da América do Sul e Central, África, Sudeste Asiático e Oceania, por seu aroma, produtividade e caráter resistente a doenças (Wickramasuriya; Dunwell, 2018).

O cacaueiro, é uma cultura que necessita de sombreamento para o desenvolvimento e produção em larga escala, (Dias, 2022). Por isso, é comum a inserção dessa cultura em sistemas agroflorestais, conhecidos como cabruca, onde plantas nativas e endêmicas da Mata Atlântica fornecem o sombreamento necessário para a cultura (Figura 1), gerando um sistema sustentável, onde espera-se a conservação da floresta nas áreas de produção (Lobão et al., 2007; Dias, 2022).

Figura 1- Sistema agroflorestal para o cultivo de cacau, mais conhecido como cabruca. Fonte: <https://yam.com.vc/alimentacao/800686/o-cacau-que-transforma-vidas>, 2019. Acesso em 15 de agosto de 2022.

Os números em relação a produtividade de cacau no mundo, revelam a importância dessa cultura. Só em 2019, foram aproximadamente 5,6 milhões de toneladas produzidas (FAOSTAT, 2020). O maior produtor mundial é a Costa do Marfim, com 39,0%, seguido de Gana (14,5%), Indonésia (14,0%), Nigéria (6,3%), Equador (5,1%), Camarões (5,0%) e o Brasil (4,6%), considerado o sétimo maior produtor (FAOSTAT, 2020). Juntos esses países produzem cerca de 88,4% da produção mundial de cacau (FAOSTAT, 2020).

A produção brasileira se concentra em áreas setentrionais do país (Norte e Nordeste). Porém, o norte dos estados de Espirito Santo e Minas Gerais, também contribuem com a produção brasileira de cacau (2,8%). Atualmente, concentra-se na Bahia a maior área plantada de cacau (69,7%), porém, a produção é maior na região Norte do País, sendo responsável por

53,2% da produção do Brasil enquanto na região Nordeste temos 42% da produção nacional (Figura 2) (Brainer, 2021).

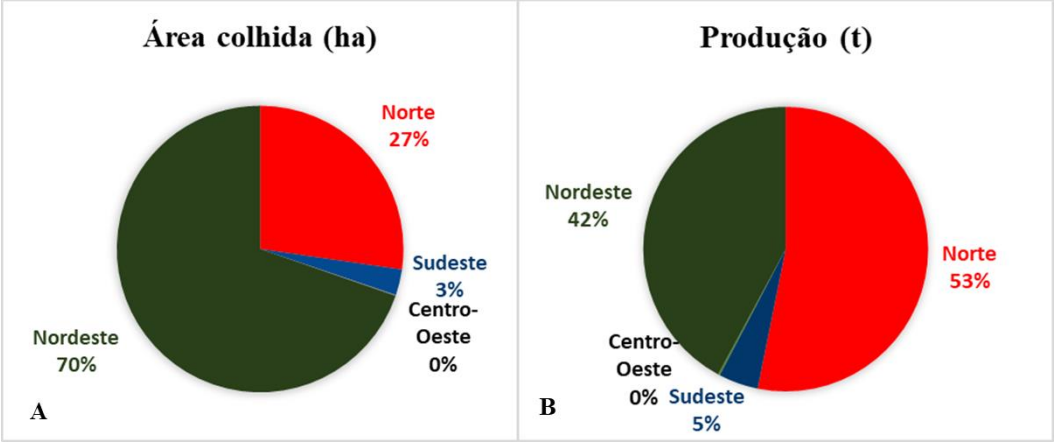

Figura 2- Distribuição nacional entre área colhida e a produção de cacau. Na imagem A - área colhida em hectares (ha)e na imagem B - produção de cacau em toneladas (t). Dados relacionados a safra de em 2020 de Brainer, 2021 (adaptado).

O fruto dessa cultura que se originou nos trópicos úmidos da floresta tropical, produz sementes que desempenham um papel significativo na economia dos países produtores e consumidores (Juby et al., 2021). Dados de produção tão altos, no Brasil e no mundo, demonstram o quanto o cacaueiro é uma cultura de alto valor, principalmente no âmbito industrial, visto que o cacau é a única fonte de chocolate.

A exigência do mercado por produtos de alta qualidade e orgânico, também engloba o cacaueiro, pois os consumidores estão cada vez mais preocupados com a segurança alimentar, questões ambientais e principalmente, a origem do produto adquirido (Montagna et al., 2022). Todos esses atributos são exigidos não só na produção orgânica, mas, também nos maiores sistemas de produção, onde leva-se em consideração a qualidade da amêndoa, tanto no aspecto físico, como químico, atendendo as exigências de fabricantes e compradores. Se esses critérios não forem levados em consideração, uma grande porção das amêndoas a serem torradas, não desenvolverão o sabor característico, levando à perda de várias amêndoas, redução da qualidade do chocolate produzido, bem como a redução dos subprodutos oriundos do cacau (Nascimento, 2010; Cruz, 2012).

Para manter os parâmetros de qualidade, foram documentados em detalhes parâmetros específicos para incentivar a comunidade cacaueira a produzir cacau de melhor qualidade pela Associação Francesa de Chocolate, Biscoitos e Confeitaria (CAOBISCO), Associação Europeia de Cacau (ECA) e a Federação do Comércio de Cacau (FCC) (CAOBISCO/ECA/FCC, 2015). Esses parâmetros de produção estabelecidos, possuem

influência direta na fabricação e com o tempo, tornaram-se padrões comerciais empregados em todo o mundo (Quelal-Vásconez et al., 2020). Essas características de qualidade incluem sabor, pureza, condições sanitárias (cultura livre de micotoxinas, agentes químicos, agrotóxicos e etc.), características físicas (tamanho do grão, rendimento do embrião, consistência, uniformidade do grão, teor de casca e etc.) e características associada a manteiga de cacau (como o teor de ácidos graxos livres no produto) (Wickramasuriya; Dunwell, 2018).

Características como o teor de gordura (ácidos graxos), aumentam o valor do fruto e do comércio internacional de chocolate que está avaliado em US$ 103 bilhões por ano (Zion Market Research, 2018). Cacau e chocolate fazem parte dos alimentos de luxo mais consumidos em todo o mundo (aproximadamente 9 kg/ano/pessoa nos países da Europa Ocidental) (Beckett, 2008). A popularidade do chocolate deve-se essencialmente às suas propriedades sensoriais agradáveis (Magagna et al. 2017), benefícios a saúde (Brandão, 2021) e às emoções positivas que o seu consumo suscita (Magagna et al. 2017; Konar et al. 2016)

A fim de obter a qualidade dos produtos finais, podemos afirmar que se a qualidade do grão de cacau for ruim, desde o início da cadeia produtiva, a qualidade dos produtos finais podem ser de péssima, ou de nenhuma qualidade. Por conta disso, com o objetivo de solucionar problemas oriundos do cultivo, padronizar e aumentar a qualidade do produto no Brasil e outras atribuições, foi criada a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) em 1957, por meio do Decreto 40.987 (BRASIL, 1957). A sua principal função é de recuperar lavouras, aumentar e melhorar as condições de colheita e criar meios para combater pragas e doenças, proporcionando aumentos consideráveis na produção de cacau, o que aconteceu logo após a sua criação, onde o Brasil, nas décadas de 1970 e 1980 foi o maior produtor de cacau no mundo (Fernandes, 2020).

Visando manter a qualidade e a alta produção, vários estudos relacionados à saúde do cacau e as pragas que acometem a cultura, entraram no foco da pesquisa naquela época (Zimmermann; Ellinger, 2020) e se estendem até os dias atuais, monitorando várias espécies de fitopatógenos que possam causar declínio na produção (Barsottini et al., 2019; Chitiva-Chitiva et al., 2021; Vaca et al., 2020; Molano et al., 2018; Alves-Júnior et al., 2021). Um grande exemplo disso são estudos genéticos que identificam genes envolvidos na mediação de doenças que afetam significativamente na produção de cacau e seus subprodutos, pois, infelizmente, surtos de doenças nas principais áreas de cultivo do cacau, afetaram significativamente a produção na América do Sul, especialmente no Brasil (Wickramasuriya; Dunwell, 2018). Um

grande exemplo disso, são os dados obtidos através do ICCO, onde elucidam, que até 38% da colheita anual global de cacau é perdida devido a pragas que acomete a cultura (ICCO, 2017).

2.2 - A Vassoura-de-Bruxa e o cacaueiro

Em 1987, uma das principais doenças que acometem o cacaueiro, gerou uma crise no Brasil e veio a agravar-se em 1989 (Oliveira; Luz, 2005; Queiroga et al., 2021). A doença conhecida popularmente como Vassoura de bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* se disseminou facilmente, dizimando os cacaueiros (principalmente na microrregião do sul da Bahia, maior produtora de cacau da época). Essa crise, juntamente com a queda de preço no mercado internacional, trouxe grandes problemas socioeconômicos, refletidos fortemente na década de 90, onde o Brasil, principal exportador de cacau daquela época, se tornou importador da fruta (Bahia de Aguiar; De Moura Pires, 2019).

Essa doença, não só causou declínio na produção de cacau e problemas socioeconômicos, como também contribuiu para diversos impactos ambientais na região sul da Bahia. Os agricultores com o objetivo de driblar a crise que se instaurou na época, passaram a cultivar outras culturas e até mesmo criar animais nas áreas de cabruca, fazendo com que houvesse uma destruição de parte da Mata Atlântica da região (Meinhardt et al., 2008; Dias, 2022).

Moniliophthora perniciosa, que anteriormente era conhecido como *Crinipellis perniciosa* (Singer) Stahel, é um fungo basidiomiceto hemibiotrófico que causa a doença da vassoura-de-bruxa no cacaueiro (Purdy; Schmidt, 1996; Mondego et al., 2008). A vassoura-de-bruxa (*M. perniciosa*), a monilíase do cacau (*Moniliophthora roreri*) são causadas por espécies irmãs dentro da família de cogumelos Marasmiaceae (Evans, 2007). Essas doenças junto com a podridão parda (*Phytophthora palmivora*) são as mais importantes e mais estudadas que afetam a cultura do cacau, pois, juntas são responsáveis por grandes perdas no mercado do cacau.

Este fungo infecta uma variedade de hospedeiros pertencentes a outras famílias através de vários biótipos (C, B, S, L e H) (Mondego et al., 2008), infectando respectivamente famílias como Malvaceae, incluindo espécies do gênero Theobroma (Alves et al., 2021), Apocynaceae (Wang et al., 2022), Rutaceae (Ghosh et al., 1999; Wang et al., 2022), Pedaliaceae (Al-Sakeit et al., 2005), Paulowniaceae (Hiruk, 1997), Zygophyllaceae (Win et al., 2013), Solanaceae (Paschoal et al., 2022), Bixaceae (Bastos; Andebrhan, 1986); Bignoneaceae (Griffit; Hedger, 1994) e Malpighiaceae (Resende et al., 2000); (Lisboa et al., 2020).

A doença se caracteriza em dois estágios no primeiro, o patógeno requer reprodução em tecidos vivos vegetativos do hospedeiro para nutrição; na segunda alimenta-se de tecido morto (Rocha; Wheeler, 1985; Oliveira; Luz, 2012). A transição da fase biotrófica para a fase necrotrófica é facilitada pela presença de vários compostos, genes e proteínas que induzem morte celular programada (Ceita, 2007; Dias et al., 2011; Alves et al., 2020). A vassoura-de-bruxa, causada por *M. perniciosa* é uma doença tão devastadora, que sua sintomatologia, pode ser facilmente observada em uma planta infectada nos dois estágios.

O primeiro estágio da doença começa através de um esporo, que nada mais é do que um gameta do fungo. Esse esporo se adere a um tecido vegetal, de ramos ou frutos em crescimento (Mondego et al., 2016). Após estabelecer-se, o que era um gameta, se torna um conjunto se células formadas por um só núcleo, formando hifas (Purdy; Schmidt, 1996; Dressano, 2019). Esta mudança ocorre, porque *M. perniciosa* apresenta reprodução assexuada como estratégia reprodutiva (Delgado, 1976; Mondego et al., 2016), passando de micélio monocariótico para dicariótico sem a necessidade de acasalamento entre indivíduos compatíveis (Mondego et al., 2016). As hifas por sua vez, tem a capacidade de penetrar os tecidos meristemáticos, ou adentrarem nas células da planta via apoplasto, facilitando esse processo quando há uma lesão, ou ferimento na epiderme (Scotton, 2012). Após adentrar nos tecidos jovens da planta, que por sua vez, ainda são pobres em nutrientes, o fungo causa uma hipertrofia significativa, gerando assim a perda da dominância apical e o surgimento de vários brotos, o que chamamos comumente de vassoura verde (Santos et al., 2017). Nessa mesma fase da doença, é possível notar a alteração do teor de carboidratos, ou seja, açúcar e amido na planta como um todo (Scarpari et al., 2005), além do surgimento de alterações no fruto, que corrobora para o prejuízo econômico, já que as sementes ficam inviáveis para consumo e utilização no processamento para a fabricação do chocolate (Pereira; De Almeida; Santos, 1996).

No segundo estágio da doença, é possível notar o quanto o fungo *M. perniciosa* é devastador. Em poucas semanas, a depender do grau de infecção, os ramos que foram produzidos em excesso e as vassouras verdes apresentam necrose, devido a substâncias secretadas pelo fungo, para que o mesmo possa obter sucesso, perante a planta infectada (Alves et al., 2020). Por isso, em torno de 60 a 90 dias de infecção, as partes afetadas da planta tornam-se secas (Silva et al. 2002). Dependendo das condições de temperatura, umidade e precipitação, o fungo poderá formar nos ramos necrosados e secos, o seu basidiósporo e os esporos, completando o processo de infecção e o seu ciclo de vida (Figura 3) (Evans, 1980).

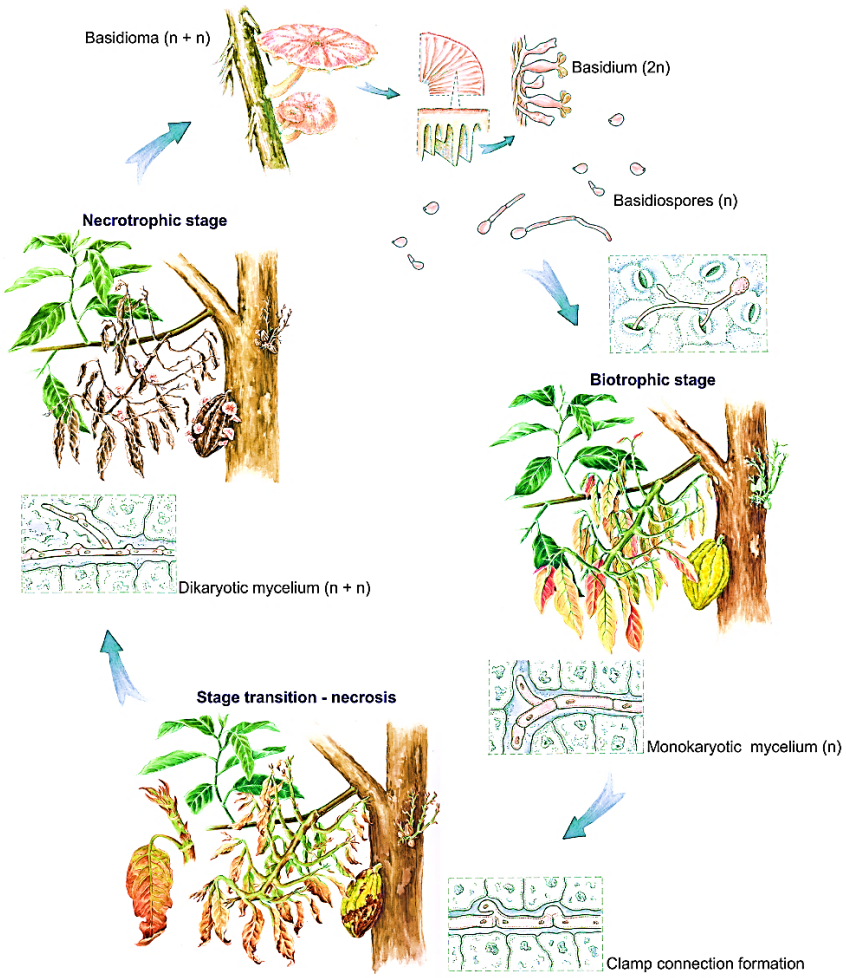

Figura 3 – – Representação esquemática do ciclo de vida do fungo *M. perniciosa* em *T. cacao* na fase biotrófica e necrotrófica (Teixeira; Thomazella; Pereira, 2015).

É possível notar que a infecção por *M. perniciosa* possui uma sintomatologia que é facilmente observada a olho nu (Figura 4). Os sintomas de uma planta adulta infectada no primeiro estágio incluem: broto vegetativo engrossado (Figura 4A) em gemas laterais, com proliferação desordenada das gemas (cancro) (Figura 4B), surgimento de ramos vegetativos e florais que se desenvolvem como vassouras, podendo chegar a 60cm de comprimento, surgimento de estruturas rosas em formato de flores (basidiocarpos), que além de surgir nos ramos vegetativos (Figura 4C), podem surgir nos frutos, danificando as amêndoas o que caracteriza o início do segundo estágio (Pérez-Vicente, 2018).

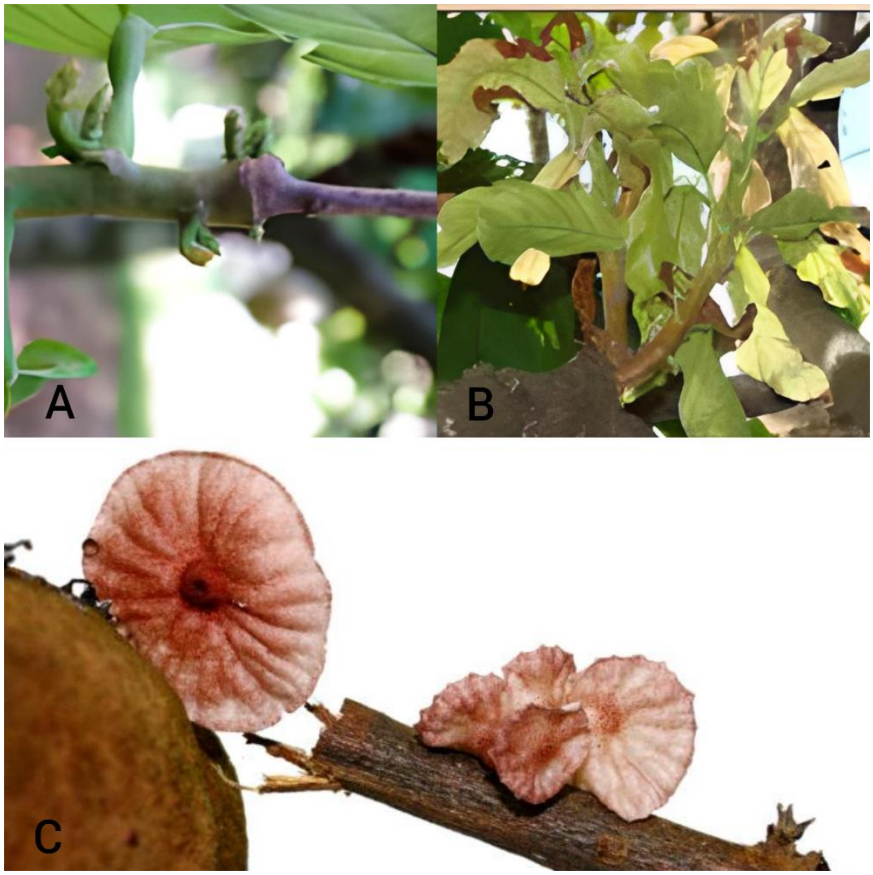

Figura 4 – Ramos do cacaueiro infectados com o fungo *M. perniciosa*. A- Fase biotrófica da infecção, onde há o engrossamento do broto vegetativo que é chamado comumente de vassoura verde. B- Super brotamento e proliferação desordenada dos ramos na fase biotrófica (CEPLAC, 2017). C- Fase necrotrófica, onde é possível notar o surgimento de cogumelos, os basidiósporos (EMBRAPA, 2015) (Imagens adaptadas).

A sintomatologia em plantas jovens, diferencia-se pouco das plantas adultas, pois, ao invés de ocorrer a proliferação de gemas laterais, o fungo infecta a gema apical, produzindo muitos brotos inchados e indesejáveis (vassouras), para o crescimento das plantas, além da queda de folhas, causando a morte das plântulas (Ribeiro et al., 2016). As flores anormais levam a germinação de frutos alterados (semelhantes ao morango e cenoura) (Figura 5A), onde suas vagens possuem amarelecimento precoce, cascas escuras com depressões e lesões (Figura 5B), danos às sementes e polpa (Figura 5C), além de vagens endurecidas, que também poder dar origem aos esporocarpos (cogumelos) na superfície da vagem infectada (Figura 5d), caracterizando a principal sintomatologia relacionada ao segundo estágio (Oliveira; Luz, 2012).

Figura 5 – Sintomas e Sinais de Vassoura de bruxa no fruto de cacaueiro. A - Frutos em formato de morango ou cenoura (CEPLAC, 2017). B - Frutos já desenvolvidos acometidos pela infecção, passam por amarelecimento precoce, que progride para manchas escuras e depressões no fruto. Fonte: <https://www.agrolink.com.br/problemas/vassoura-de-bruxa_1625.html>. C – A infecção por *M. perniciosa* danifica o cacau, inviabilizando a polpa e as sementes. Fonte: < https://biblioteca.incaper.es.gov.br/>. D – Os cogumelos também podem surgir no fruto, indicando a necrose nos tecidos, fazendo com que o ciclo de vida seja reiniciado. Fonte: < https://www.agrolink.com.br/problemas/vassoura-de-bruxa_3046.html>. (Imagens adaptadas).

Cada basidiocarpo libera até noventa milhões de novos esporos do fungo, isso explica a devastação que uma só planta infectada poderá trazer a uma fazenda de cacau (Baker et al., 1957). Geralmente o resultado dessa infecção é a perda de 30 a 50% da produção (Evans; Prior, 1987), podendo chegar a 90% (Rudgard, 1986; Pereira, 2000; Oliveira; Luz, 2012).

O estabelecimento de propágulos pelo fungo, são essenciais para as próximas infecções, pois é através dele que os fungos irão infectar outros tecidos meristemáticos (brotos, flores e frutos), de outras plantas estabelecendo uma relação biotrófica com seu hospedeiro (Purdy; Schmidt 1996). Por isso, neste estágio biotrófico, o patógeno faz com que a planta envie nutrientes para o crescimento e desenvolvimento a partir do apoplasto do hospedeiro garantindo a sua permanência e o surgimento de consecutivas gerações (Evans, 1980; Lawrence et al. 1991; Silva et al. 2002).

As vassouras vegetativas são epidemiologicamente mais importantes do que infecções do fruto, ou almofadas de flores, pois são a fonte mais produtiva e consistente de inóculo no campo, determinando assim a quantidade de esporos a serem gerados (Schmidt et al., 1993). O

número e o tamanho das vassouras, são componentes importantes para a resistência do cacaueiro à vassoura-de-bruxa, pois determinam o grau de infecção da planta pelo patógeno e a capacidade reprodutiva do mesmo (Wheeler, 1999).

A quantidade de vassouras define a quantidade de esporos do fungo *M. perniciosa* que são liberados principalmente à noite, onde as condições de temperatura e umidade atingem as condições ideais para a propagação do mesmo, podendo ser disseminados pela água, vento e variados insetos de vida noturna, que espalham os seus esporos em toda lavoura, podendo causar infecção em outras plantas, ou assumem a forma de latência por longos períodos de tempo no solo (Meinhardt et al., 2008; Pohlan; Pérez, 2010; Ferraz et al., 2021). *M. perniciosa* também carrega uma grande família gênica que codifica genes relacionados à patogênese com várias funções propostas, incluindo ações como fatores de virulência (Teixeira et al. 2012; Marelli et al., 2019). Todos esses fatores contribuem para a excepcional virulência de *M. perniciosa* e explica porque uma plantação inteira e lavouras que estão em grandes distâncias, podem ser facilmente comprometidas após a infecção inicial de uma única planta de cacau (Ferraz et al., 2021).

A contaminação pelo fungo também pode se dar por material de propagação (estacas e mudas contaminadas) (Rocha; Wheeler 1985). Na tentativa de realizar enxertia com variedades que são mais resistentes a doença, se a planta resistente estiver infectada pelo material de propagação, todo o ciclo da doença recomeçará, dando início a uma sucessão de infecções.

Até os dias atuais, os danos causados pela vassoura-de-bruxa, refletem muito na produção brasileira de cacau. Especulações insinuam que supostamente o fungo *M. perniciosa* foi inserido na região sul da Bahia por motivo torpe, politicamente motivado, através de galhos doentes trazidos da Amazônia (Policarpo Junior, 2006). Atualmente, esse ato foi aceito como agro terrorismo (Lisboa et al., 2020). A possível disseminação da doença em todo o mundo é preocupante e é considerada uma séria ameaça ao futuro da indústria de subprodutos do cacau (Wood; Lass, 1985). O controle da doença por meio de medidas sanitárias ou de controle químico, não é apenas muito caro (Thorold, 1943; Zadoks, 1999), mas também impraticável (Laker et al., 1989). Pois, como já foi mencionado, um basidiósporo, tem a capacidade de produzir muitos esporos, tornando-se inviável o controle sanitário dos mesmos. Além disso, medidas de controle químico, fariam com que as amêndoas perdessem a qualidade e a capacidade de produção *in natura* dos subprodutos do cacau, visto que o mercado nacional e internacional está cada vez mais exigente.

Por conta da dependência econômica da cultura do cacau pra geração de novos empregos na região sul da Bahia, após o advento da vassoura-de-bruxa, houve uma queda significativa na produtividade, abandono de lavouras, descapitalização e endividamentos dos cacauicultores, redução da oferta global, êxodo rural, falências de empresas comerciais e industriais, desabastecimento do parque moageiro, compra de amêndoas do mercado exterior, levando a importação do cacau, além do crescimento do desemprego direto e indireto na cidade e no campo, levando a região a um desaquecimento em sua economia (Oliveira, 2017).

Não só a incidência da vassoura-de-bruxa exercera um profundo impacto negativo sobre o agronegócio do cacau, mas, a maior pressão sobre os recursos naturais, refletida no aumento de sua exploração de forma inconsequente e predatória, a ocorrência de estiagens em virtude das mudanças climáticas e outras doenças como a podridão parda por exemplo, fez com que houvesse uma queda dos preços do cacau (Mascarenhas, 2004).

Visando reverter a baixa produtividade, a CEPLAC optou pela técnica de enxertia para obtenção de variedades clonais de cacaueiros resistentes à "vassoura-de-bruxa" e com alta produtividade de frutos (Mandarino; Gomes, 2009). Instituições, universidades e empresas de pesquisas relacionadas ao cacau continuam adotando medidas para o controle desta doença, adotando técnicas agronômicas e moleculares para reverter o quadro de baixa produtividade dos cacaueiros, voltando a alavancar a produção (De Souza Rodrigues; Pires; Luz, 2019).

As medidas propostas para o controle da vassoura-de-bruxa estão incluídas no manejo integrado da doença, utilizando-se métodos de controle químico, genético, cultural e biológico (Costa et al., 2006). Essas ações, promovem o aumento do nível de resistência e durabilidade de novas variedades comerciais (Silva et al., 2010).

As principais vertentes de estudos têm como alvo, a obtenção de genótipos resistentes à Vassoura de bruxa e variedades com características agronômicas desejáveis, que produzam amêndoas que atendem as exigências do mercado nacional e internacional, além de buscar o controle biológico de pragas, obtendo produtos químicos ou alternativos, que não diminuam a qualidade das amêndoas (Gramacho et al., 2016).

2.3 – As fontes alternativas de carbono e o crescimento dos fungos

O processo de utilização das fontes de carbono como fonte de energia, é uma necessidade fundamental de todos os organismos vivos e representa a condição básica necessária para o crescimento, evolução e sobrevivência (Ribeiro et al., 2021). Para habitar e

sobreviver com sucesso em nichos dinâmicos e contrastantes do hospedeiro, patógenos oportunistas devem ser capazes de manifestar uma adaptação robusta e bem-sucedida às mudanças na disponibilidade de nutrientes. Para tanto, tais organismos necessitam de uma flexibilidade em alternar vias metabólicas para regular mecanismos distintos de absorção de nutrientes e modular seu metabolismo de com a disponibilidade de recursos do hospedeiro (Ene et al., 2014; Qadri et al., 2021).

Os fungos são organismos que conseguem se adaptar a essas mudanças na disponibilidade de fontes de carbono, devido a ativação molecular de vias alternativas do metabolismo (Conrad et al., 2014; Ribeiro et al., 2021). A utilização dessas fontes alternativas, aumentam a versatilidade metabólica e permitem que os fungos usem uma variedade de compostos complexos como fontes de nutrientes (Keller e Hohn, 1997; Medina et al., 2004). Esse mecanismo evolutivo, favoreceram os fungos conhecidos como patógenos oportunistas (Zhang, 2021).

A glicose representa a fonte primária de carbono e o açúcar mais facilmente catabolizado para quase todas as espécies microbianas, devido ao seu fornecimento instantâneo de energia para realizar os processos vitais de sobrevivência e colonização de nicho (Dos Reis et al., 2016). Devido a essas características, os fungos utilizam preferencialmente a glicose para a regulação do crescimento e metabolismo (Dos Reis et al., 2013; Qadri et al., 2021). A taxa de fosforilação do substrato está intimamente ligada com os níveis de ATP para a geração de energia. Se não houver disponibilidade suficiente desse açúcar no meio, as células do organismo serão incapazes de sustentar a viabilidade ou metabolismo das atividades celulares (Teusink et al. 1998) (Bisson; Fan; Walker, 2016).

A assimilação de todas as moléculas de glicose e outros açúcares que são altamente favoráveis ocorre antes que o organismo mude a absorção de outros açúcares menos favoráveis (fontes alternativas de carbono). Enquanto a glicose estiver presente no meio, ocorre o processo que chamamos de sistema de Repressão do Catabólito de Carbono (CCR). Esse sistema ajuda os organismos a obter a quantidade máxima de glicose para acompanhar seu metabolismo, desligando as enzimas necessárias para a utilização de fontes de carbono menos preferíveis (Ries et al., 2016; Adnan et al., 2018) e reprimindo a expressão de genes alternativos que contribuem para o metabolismo de outras moléculas fornecedoras de energia (Lagree et al., 2020). Além de regular a absorção de nutrientes, o CCR permite que os microrganismos adaptem sua fisiologia ao ambiente do hospedeiro, impactando sua virulência e sobrevivência (Adnan et al., 2018; Qadri et al., 2021).

Este efeito repressivo é mediado por múltiplas interações regulatórias interligadas e vias de sinalização. Por conta dessa atividade da maquinaria celular, a glicose frequentemente exclui a utilização de outras fontes alternativas de carbono, como o glicerol por exemplo (Kayikci e Nielsen, 2015). Quando as moléculas de glicose do meio se esgotam, a mudança para uma fonte de carbono diferente é caracterizada por um período de transição que tem como consequência o retardo do crescimento celular do organismo e a remodelação molecular, para que haja o provimento de energia necessário para as células, pois, diante de uma mudança tão drástica de uma fonte de açúcar fermentável para uma fonte de açúcar que ative a cadeia respiratória, os fungos necessitam de uma dramática reprogramação da maquinaria celular. (Klein, 2017)

A respiração aeróbica de fontes de carbono não fermentáveis como glicerol nas mitocôndrias leva à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que ativam a resposta ao estresse oxidativo (OSR). Para manter o crescimento contínuo, a maquinaria celular do fungo necessita reconhecer e lidar com ROS para manter a homeostase celular e o crescimento contínuo. Em leveduras, as principais ROS espécies são o peróxido de hidrogênio e o superóxido, que além de serem prejudiciais a célula, possuem efeito sobre os processos celulares e podem atuar como moléculas de sinalização, levando a ativação de uma infinidade de vias de resposta ao estresse (Temple et al. 2005). As ROS são produzidas normalmente como parte das atividades catabólicas, porém, essas moléculas prevalecem durante a troca da glicose para fontes de carbono não fermentáveis como o glicerol (Boveris 1984; Gray e outros. 2004). (Bisson; Fan; Walker, 2016)

Esses mecanismos de resposta ao estresse, são importantes pois podem ativar o mecanismo de proteotoxidade da célula, pois as ROS podem causar perda de proteínas relacionadas a homeostase ou proteostases, interferindo gravemente nas funções celulares normais. Uma das proteínas de respostas ao estresse encontrada no secretoma de fungos que são bem caracterizadas são as proteínas de Choque Térmico (HSR). Fatores de transcrição relacionadas ao choque térmico medeiam uma série altamente conservada de mudanças na regulação gênica, levando à expressão e ativação de uma família de proteínas citoprotetoras conhecidas como Heat Proteínas de choque (Pirkkala et al. 2001; Westerheide et al. 2012; Wu 1995). Devido à aglomeração molecular causada por concentrações extremamente altas dessa proteína, o transporte e metabolismo de glicerol responde dinamicamente para promover a adaptação e manter homeostase. (Bisson; Fan; Walker, 2016).

Isso acontece porque o glicerol age como estressor, levando a depressão da atividade da água nos organismos. Isso pode explicar a não utilização da água disponível no ambiente durante um certo período, o que pode levar a um nível inibitório de atividade caotrópica (Williams e Hallsworth, 2009; Cray et al., 2013b; de Lima Alves e outros, 2015) (mattenberger; 2017) Por isso, muitas vezes a atividade metabólica ou a capacidade de crescer em glicerol é reduzida ou abolida. Porém, com a expressão ou superexpressão de genes relacionados a via de degradação do glicerol, a atividade metabólica e o crescimento podem ser retomados.

2.4 - A Proteômica

Uma das alternativas para manter a qualidade do fruto no que diz respeito ao controle das pragas, é estudando o patógeno, para que se possa estabelecer vias de combate ao patógeno, que não se utilizem de tantas alternativas químicas/agrotóxicos. Nesse sentido, o estudo das ômicas (genômica, proteômica, transcriptômica, metabolômica e lipidômica) em conjunto, podem desvendar uma série de elementos dos sistemas biológicos do patógeno, que podem levar a compreensão de doenças vegetais complexas, além de identificar os inúmeros fatores genéticos, epigenéticos e ambientais envolvidos na patogenicidade (Mcardle; Menikou, 2021).

A proteômica e a transcriptômica podem ser úteis em uma gama de estudos de patogenicidade, porém, são facilmente confundidas quanto a sua finalidade. A proteômica se caracteriza por fornecer informações sobre os mais diversos tipos de enzimas, facilitar no estudo de proteínas que são fortes candidatas para atuar como terapia-alvo, *splicing* alternativo, além contribuir para o conhecimento de transcritos de RNA, distinguindo e quantificando diferentes proteoformas de um único gene derivado de variação genética, levando a uma enorme compreensão dos processos biológicos e entendimento de patologias, ou objetos de estudo (Smith, 2018). A transcriptômica elucida a abundância de transcrições individuais, mas não diretamente sobre a abundância ou estado de proteína, por isso a correspondência entre os níveis de expressão de genes e proteínas é frequentemente pobre (Rogers et al., 2008).

Nos últimos anos, levando em consideração a plataforma livre do PubMed, os estudos envolvendo a proteômica, se tornaram tão abundantes quanto o estudo da genômica e outras pesquisas baseada em “ômicas” (Figura 6) (Monti et al., 2019). Esses estudos evoluíram de tal forma, que passaram da mera identificação de proteínas para a sua quantificação global, descrição de proteínas e abundância em determinado meio, comparação de expressão proteica em diferentes tratamentos, modificações pós-traducionais, caracterização, identificação das

vias bioquímicas subjacentes aos processos biológicos dentre outros (Jorrin-Novo et al., 2019; Winter; Wilkins; Donald, 2019).

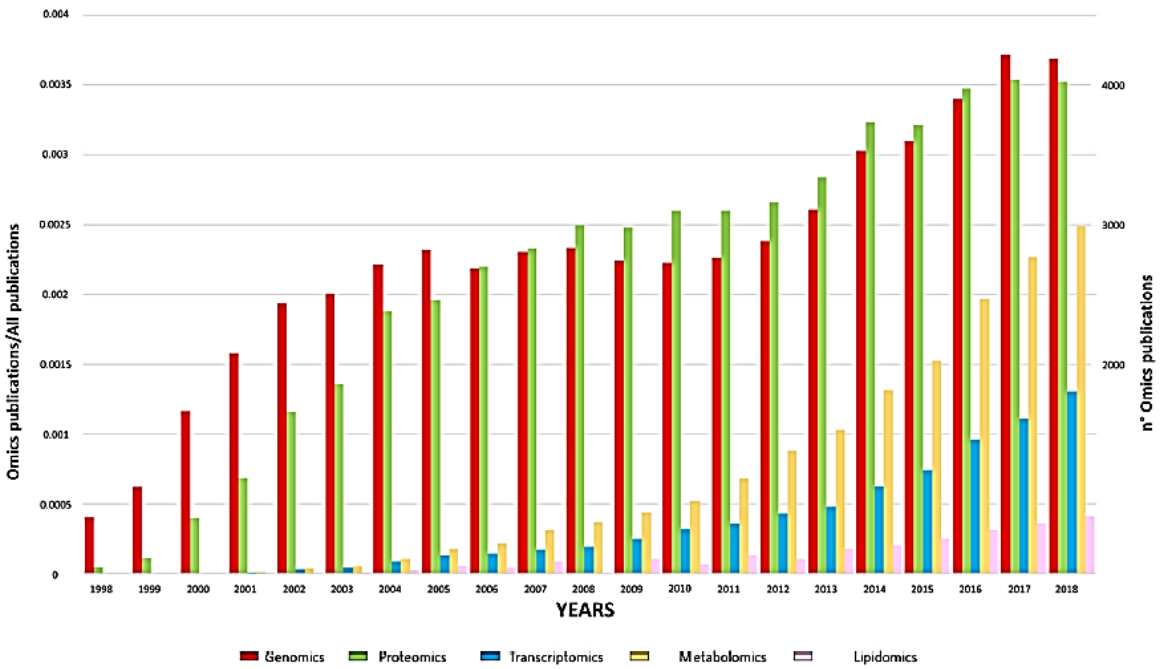

Figura 6- Publicações de estudos do banco de dados *PubMed* utilizando tecnologias Ômicas do período de 1998 a 2018 (Monti et al., 2019).

Por isso, a vantagem das análises proteômicas é estudar o produto final da expressão gênica, ajudando a compreender o que realmente está sendo traduzido, permitindo a elaboração de um perfil acumulado dessas proteínas que podem ser influenciadas por alterações transcricionais e pós traducionais, como a remoção de peptídeos de sinal, fosforilação e glicosilação, as quais são extremamente importantes para as atividades das proteínas e localização subcelular (Fernie; Stitt, 2012; Reis et al., 2020). Por conta dessas alterações, muitos estudos envolvendo genômica e transcriptômica estão associados à baixa correspondência com a expressão de seus genes codificadores (Gygi et al., 1999; Dos Santos et al., 2020).

Mas, a proteômica não se limita apenas a estudar o produto final e o perfil de proteínas acumuladas. Ela contribui para o reconhecimento qualitativo e quantitativo do grande número de proteínas que influenciam diretamente a bioquímica e o funcionamento das células, afetando a fisiologia do indivíduo, trazendo respostas com relação a influência de proteínas no crescimento, desenvolvimento e seu comportamento contra determinados estímulos ambientais quando o mesmo é submetido a situações de estresse biótico ou abiótico (Chen; Harmon, 2006; Dória; Pirovani, 2019).

Por conta dessa ampla abordagem, o estudo da proteômica favorece a compreensão de diversas fitopatologias. Pesquisas envolvendo doenças fúngicas que acometem outras culturas, tem demonstrado a importância do estudo de proteínas e enzimas envolvidas no processo de patogenicidade (Alvim et al., 2009; Darwiche et al., 2017; Barbosa et al., 2018; Fiorin et al., 2018; Moretti-Almeida et al., 2019; Alves et al., 2020; Vasconcelos et al., 2021).

Assim, podemos afirmar que várias proteínas conjuntamente, favorecem o sucesso dos fitopatógenos fúngicos, fazendo com que eles sejam capazes de produzir grandes quantidades de enzimas hidrolíticas extracelulares que são necessárias para degradar as barreiras físicas da planta durante o processo de infecção do tecido (Narayanasamy, 2008). Essas proteínas atuantes no processo de degradação dos polissacarídeos, garantem a sua eficiência, produzindo um extenso arsenal de enzimas ativas para garantir o seu sucesso sob a planta infectada (Santos et al., 2017).

A proteômica tornou-se uma ferramenta crucial para a identificação das causas e graus de evolução de patologias que acometem plantas e animais, gerando hipóteses, dados e uma série de análises funcionais nos últimos tempos (Monti et al., 2019). Essa área das "ômicas" tem revolucionado a ciência com controle de patologias, vacinas em seres humanos, combate a patógenos que trazem prejuízos no ramo da agricultura entre outros (Amaral et al., 2021; Mappa et al., 2021; Khan et al., 2022; Liu et al., 2022; Lu et al., 2022; Zhang et al., 2022). No que diz respeito às pragas que trazem prejuízos à agricultura, é através da integração de dados genômicos já conhecidos em bancos de dados e a elaboração de perfis proteômicos, que podemos fornecer uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares de resposta ao estresse da planta e do patógeno (Reis et al., 2020).

Fazendo uma rápida análise das pesquisas atuais entendemos que, em muitas delas, a abordagem proteômica, torna-se essencial para completar o entendimento acerca da caracterização da estrutura e função de vários tipos de organismos vivos, incluindo fungos (Loginov, 2016).

A tecnologia chave, utilizada pela proteômica para a identificação de proteínas em amostras biológicas, é a espectrometria de massas (Figura 7). Através do espectrômetro podemos identificar proteínas com uma sensibilidade significativa, precisão em relação a sua massa, identificação de alterações de proteínas entre diferentes condições de tratamento, descoberta de mecanismos patológicos que envolvem o fenótipo, além da capacidade única de

medir mudanças em misturas de proteínas complexas (Anjo; Santa; Manadas, 2017; Saleh et al., 2019).

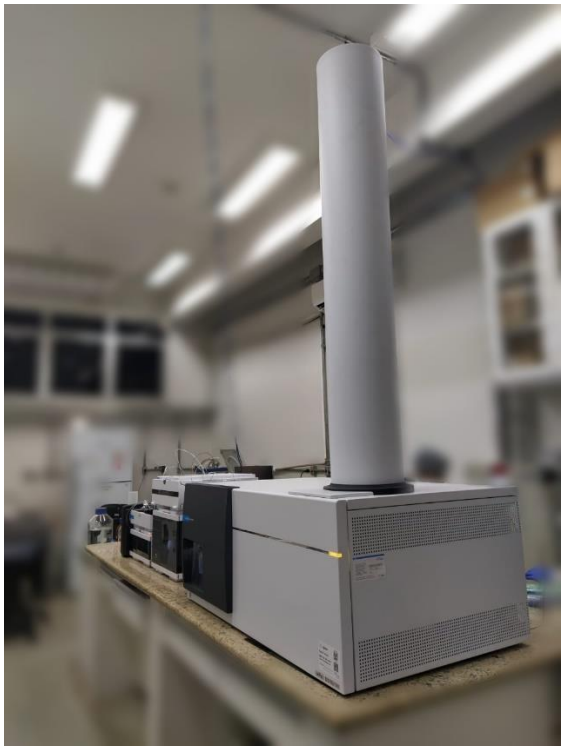

Figura 7- Espectrômetro de massas do Laboratório de Proteômica, situado no Centro de Biotecnologia e Genética da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC).

Os estudos com abordagens proteômicas, principalmente aqueles realizados com fungos, são facilitados por resultados crescentes de projetos de sequenciamento de genoma, melhorias no desempenho dos espectrômetros de massas e a disponibilidade de software para analisar milhares de espectros em questão de minutos (Loginov, 2016).

Através da identificação de proteínas, do reconhecimento de interações proteína-proteína e planta-patógeno, os estudos de expressão proteica durante o processo de infecção e a identificação de mecanismos de sinalização acionados pela planta quando submetidos a infecção, é que podemos reconhecer e definir quais moléculas desempenham um papel importante em diversas fitopatologias (Imam et al., 2017; Dória; Pirovani. 2019).

2.5 - A importância da proteômica de secretoma e micélio nos estudos de envolvendo fitopatógenos

Estudos envolvendo a proteômica de fungos, tendo como alvo o micélio (Ferreira et al., 2007; Alvim et al., 2009; Pirovani et al., 2010; Li et al., 2015; Srivasta; Araújo et al., 2017; Rezinciuc; Bulone, 2018; Zou et al., 2018; Brancini et al., 2019; Almeida et al., 2021; Cai et al., 2021; Tesei, 2021;) foram indispensáveis para entender a resistência, o metabolismo e se o

que está sendo secretado pelo patógeno modifica os micélios conforme surgem fontes de carboidratos alternativas, ou se somente há alteração conforme as condições ambientais.

Estudos prévios demonstram que a expressão de alguns genes fundamentais para o crescimento das hifas em *M. perniciosa*, podem ser induzidos ou reprimidos conforme a fonte de carbono (Pungartinik et al.,2009). Adicionalmente, a análise de outros estudos biológicos indicam que, durante o desenvolvimento de *M. perniciosa* no estado necrotrófico, o desenvolvimento do micélio foi fortemente influenciado pelo ambiente que antecedem a formação do primórdio e do basidioma (Gomes et al., 2016). Isso corrobora com a ideia de que o ambiente nutricional de *M. perniciosa* influencia diretamente no seu desenvolvimento e ciclo de vida, fazendo com que a fonte nutricional seja utilizada como estratégia para deter a doença em experimentos e estudos futuros.

Segundo Agrawal et al. (2010), secretoma é definido como um grupo global de proteínas no espaço extracelular de uma célula, tecido, órgão ou organismo em um determinado momento e condições que são "extravasadas" através de mecanismos secretores desconhecidos que envolvem organelas secretoras reguladas. Trabalhos proteômicos com secretoma de fungo já foram realizados (Medina; Kiernan; Francisco, 2004; Paper, 2007; Bonar; Wójcik; Whadyka, 2015; Gaskell et al., 2016; Leal et al., 2019; Reina, 2019; Zhao, 2020; Cai et al., 2021; Tesei, 2021) e eles são de extrema importância para que se possa conhecer os mecanismos de interações moleculares, que levam o agente infeccioso a obter sucesso sob o seu hospedeiro. Pois esses organismos possuem a capacidade de manipular a sinalização do hospedeiro e as suas vias metabólicas através de uma cascata de moléculas, que permitem o patógeno a desencadear um ambiente adequado para a conclusão do seu ciclo de vida (Hegedus; Rimmer, 2005; Kamoun, 2007; Alvim et al., 2009). Existem uma variedade de classes de proteínas secretadas durante uma interação fungo-planta que variam de proteínas estruturais, proteases, lipases, enzimas, entre outras. Esse arsenal de proteínas facilitam a conclusão do ciclo de vida do fungo (Knogge, 1996; Hegedous; Rimmer, 2005; Alvim et al., 2009), para que o mesmo possa se utilizar de uma variedade de nutrientes e compostos complexos que a planta pode fornecer para sua sobrevida (Keller; Hohn, 1997; Medina; Kiernan; Francisco, 2004; Alvim et al., 2009).

Santos et al. (2008) e Alvim et al. (2009) indicaram que, quando o glicerol se torna a principal fonte de carboidrato para *M. perniciosa*, o fungo parece desempenhar um método diferente de resistência ao estresse, podendo envolver espécies reativas de oxigênio, que desempenham um papel fundamental no processo de morte celular. Estudar o comportamento

de *M. perniciosa* em um meio com glicerol pode levar a descoberta de novos efetores e novos domínios que podem desempenhar papel crucial no desenvolvimento da vassoura-de-bruxa.

Isso acontece porque os patógenos passam por sucessivos mecanismos de adaptação, coevoluindo com as plantas no que diz respeito aos mecanismos de defesa das mesmas. Eles se adaptam a ponto de secretar um arsenal de proteínas que podem suprimir ou desencadear o mecanismo de defesa das plantas conhecido como PTI/PAMPS (Padrões Moleculares Associados ao Patógeno). Quando esse sistema não é o suficiente para suprimir a resposta do parasita, a ativação da imunidade desencadeada por efetores ou ETI entra em ação com o objetivo suprimir essa resposta (Roux et al., 2014). A imunidade mediada por efetores pode começar antes mesmo da defesa por PTI/PAMPs, devido a secreção de efetores por alguns patógenos no meio extracelular ou diretamente no citoplasma das plantas hospedeiras; esse processo silencia o mecanismo mediado por PTI/PAMPS e, por conta disso, as plantas não são mais capazes de se defender e caem no estado de suscetibilidade desencadeada por efetores (Lang, 2020).

No entanto, as plantas também tentam reverter o processo de ETI. Por conta disso, assim como os patógenos elas também desenvolveram seus arsenais proteicos, apresentando proteínas de resistência (Genes R), que tentam combater o arsenal do patógeno que apresentam genes que codificam proteínas de virulência (Avr) (Howden; Huitema, 2012). A partir desses eventos bioquímicos, surgiu a teoria gene a gene descrita por Flor (1971).

As plantas e os patógenos estão constantemente coevoluindo juntos, desenvolvendo novos efetores para obter sucesso. Enquanto as plantas desenvolvem novas proteínas “R”, os patógenos também apresentam novos genes “*avr*”, o que sugere uma constante e indefinida “corrida armamentista” na interação planta-patógeno (Coll; Epple; Dangl, 2011). Por conta disso, estudos *in vitro* que buscam analisar o secretoma de variados fungos, possui grande importância, pois um dos seus maiores objetivos é identificar novos candidatos efetores, porque o patógeno está em constante evolução (Phalip et al., 2005).

2.6- Bioinformática, proteômica e identificação de proteínas em bancos de dados

Atualmente, os estudos *in sílico* também tem ganhado muita notoriedade pelo sucesso na mineração de dados em busca de sequências de efetores nos genomas dos patógenos. Essas ferramentas têm sido utilizadas devido a possibilidade de integração de resultados computacionais baseados em dados transcriptômicos e proteômicos, melhorando a

identificação de proteínas que são realmente secretadas pelo organismo de estudo (Caccia et al., 2013).

Por conta do aumento de poder computacional na atualidade, o uso de softwares especializados na identificação dos dados obtidos por espectrometria e interações proteína-proteína, tem sido facilmente implantado e constantemente atualizado, para adequar-se à toda tecnologia recente implantada em laboratórios (Rozanova et al., 2021). Todo esse avanço, fez com que a bioinformática e as informações disponíveis em bancos de dados *online* fossem aprimoradas, contribuindo intrinsecamente para o rápido desenvolvimento das pesquisas baseadas em "ômicas", tornando os programas de melhoramento de culturas cada vez mais promissores, através de análises que trazem uma maior resposta descritiva e quantitativa dos dados (Wickramasuriya, 2018).

Métodos distintos de abordagem em bioinformática fazem com que os pesquisadores possam explorar cada vez mais a identidade molecular, bem como, as interações entre proteínas associadas a uma condição particular através de estudos envolvendo proteômica (Nesvizhskii, 2010). Por exemplo, as ferramentas desenvolvidas para a predição de proteínas efetoras baseadas em características de peptídeo sinal são de extrema importância, possibilitando identificar uma pequena sequência de aminoácidos (entre 15 e 60 peptídeos) localizada na porção N-terminal da proteína (Caccia et al., 2013). Os peptídeos sinais são encontrados em proteínas secretadas e transmembrana, bem como nas proteínas que se localizam dentro de organelas, nas células eucarióticas, onde a via secretora geral irá direciona-las através da membrana do retículo endoplasmático nos fungos (Almagro et al., 2019). Ferramentas atuais no campo da bioinformática possibilitam localizar essas proteínas secretadas através de vesículas de membrana extracelular (Rivera et al., 2016), que possuem o peptídeo sinal. Esse mecanismo é de suma importância, pois é através desse mecanismo de liberação de vesículas no meio extracelular, que ocorre o empacotamento de múltiplos fatores de virulência (Ellis; Kuehn, 2010), onde as células liberam proteínas e outras moléculas cruciais no processo de patogenicidade, desempenhando um papel importante na interação patógeno hospedeiro (Wang et al., 2018).

A proteína secretada, agora integrante do secretoma, desempenha atividades consideradas de suma importância para o desenvolvimento do patógeno. Novamente, as ferramentas de bioinformática auxiliam em uma análise de suma importância no estudo de proteínas secretadas, a análise de domínio. Essa análise representa uma das ferramentas mais importantes da bioinformática no estudo da proteômica. Um domínio é definido como uma região funcional que pode ser homóloga a outras proteínas já caracterizadas (Richardson et al.,

2016). A análise de domínio é realizada principalmente em proteínas que não são caracterizadas, com o objetivo de inferir se esta proteína foi mutada para cumprir uma função biológica adicional (Jablonowski, 2017). Essas regiões podem compreender no tamanho da proteína por completo, ou até mesmo regiões menores (Richardson et al., 2016). Através dos domínios de proteína, é possível obter informações oriundas de evolução molecular, para estabelecer classificações evolutivas, além de associações aos aspectos funcionais da proteína, como atividade enzimática, transporte de membrana ou ligação de ácido nucleico (Yang et al., 2020).

Porém, devido ao alto polimorfismo dos efetores, atribuído à sua rápida adaptação ao hospedeiro (Ellis et al., 2009), alguns candidatos a efetores quando identificados quanto a sua sequência, não possuem domínio e homologia conhecida, nem mesmo função descrita em vias bioquímicas (Barbosa et al., 2018). Os estudos de proteômica e as ferramentas de bioinformática contribuem grandemente para que novos domínios venham a ser estudados e conhecidos, para que se possa elaborar alternativas de combate ao invasor, através desse conhecimento.

Com o surgimento do sequenciamento de nova geração, também surgiram grandes impactos no campo da genômica microbiana, pois essa ferramenta permitiu o aumento exponencial da quantidade de dados gerados e a possibilidade de caracterizar novos genes candidatos a efetores em diversas espécies de patógenos, através de sequências do patógeno (Caporaso et al., 2012; Mardis, 2008). A bioinformática associada a proteômica pode favorecer o entendimento da interatômica (interação proteína-proteína) e ser útil na identificação de processos biológicos e proteínas-chave envolvidas no desenvolvimento de *M. perniciosa* (Gomes et al., 2021).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Preparo do meio de cultura, seleção da linhagem e condições de crescimento do fungo

O isolado de *M. perniciosa* utilizado (Mp4145) possui um alto grau de patogenicidade (Dos Santos et al., 2020) e foi cedido pela CEPLAC (Figura 8A e B).

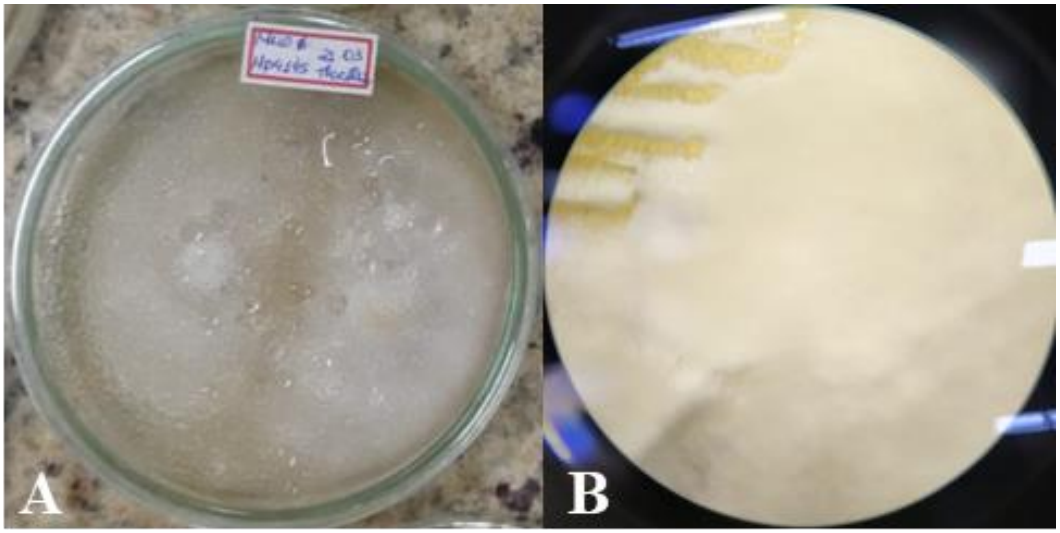

Figura 8 – Micélios crescidos em meio de cultura sólido em BOD. A- Micélio de *M. perniciosa* crescido em meio de cultura mineral sólido, visto a olho nu. B – Micélio crescido em meio de cultura sólido, visto em estereomicroscópio Leica EZ4 D.

Os micélios dicarióticos de *M. perniciosa* foram cultivados em meio mineral líquido (0,1% fosfato de amônio, 0,02% cloreto de potássio, 0,02 sulfato de magnésio, 0,5% extrato de levedura, 0,01% sulfato de cobre e 0,01% sulfato de cobre e 0,01% zinco sulfato) suplementados com 20mM (Alvim et al., 2009) das seguintes fontes de carbono: glicose (GLU) ou glicerol (GLY). O meio de cultura contendo glicose foi distribuído em 5 caixas de micropropagação (magentas) autoclavadas, com 50 mL de meio em cada uma delas. O mesmo foi feito para o meio líquido contendo glicerol. Durante a transferência do fungo do meio sólido, para meio líquido, utilizou-se um ambiente estéril (capela de fluxo laminar), onde foram transferidos 3 discos de 5mm para cada magenta contendo meio líquido (com auxílio do tubo de *eppendorff*). Esses discos foram oriundos de crescimento *in vitro* em placa de *petri* contendo ágar batata dextrose. Foi necessário a utilização da cultura com 2 semanas de crescimento, pois, foi o tempo em que os fungos tomaram a placa, e foi feito o repique, onde os discos de *M. perniciosa* foram transferidos do meio sólido para o meio líquido mineral (Figura 9).

Figura 9 – Magentas sendo preparadas em capela de fluxo laminar, com 50mL de meio de cultura líquido, onde os discos do fungo *M. perniciosa* foram colocados iniciando o crescimento.

As magentas foram vedadas com filme plástico e mantidas em sistema de fotoperíodo na Demanda Biológica de Oxigênio (BOD) a 25°C por um intervalo de 15 e 60 dias (Figura 10A e B).

Figura 10 – Magentas preparadas para serem colocadas em BOD (Demanda Biológica de Oxigênio) para crescimento do fungo M. perniciosa. A – Magentas devidamente vedadas para crescimento controlado. B – Representação da BOD do laboratório de Biologia Molecular do CBG/UESC da marca SOLAB

3.2 – Extração de proteínas

3.2.1 – Extração de proteínas do micélio tratado com Glicose e Glicerol

Os micélios crescidos em 3 magentas de cada tratamento (glicose ou glicerol), crescidos em 15 dias, foram misturados formando um *pool*, assim como o conteúdo líquido

(secretoma). O *pool* das massas miceliais, foram utilizados para o processo de extração de proteínas conforme o protocolo descrito por Pirovani et al. (2008) com modificações (Figura 11 B). Não foi realizada a separação total do meio de cultura e do micélio devido à dificuldade dessa técnica, porém as extrações de meio de cultura e micélio, ocorreram de forma separada

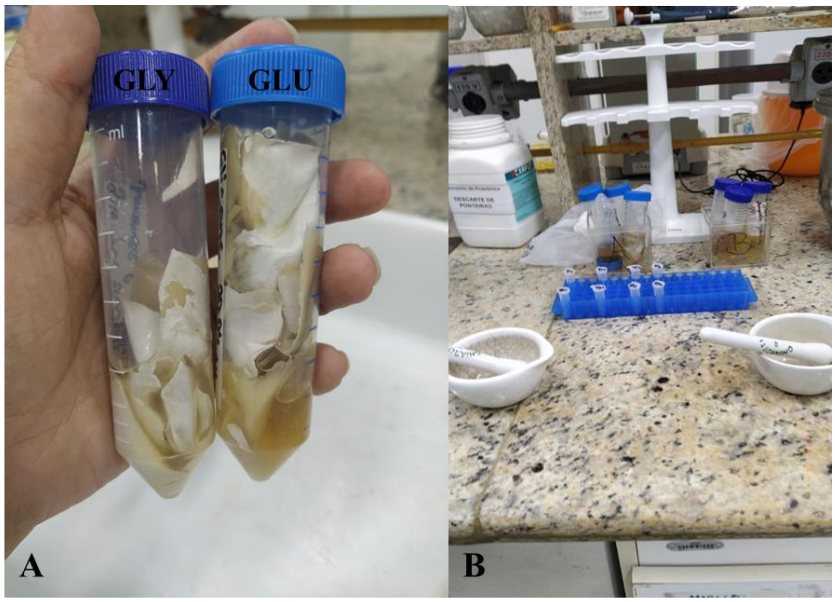

Figura 11 – Preparo das amostras miceliais de glicose e glicerol, para a extração de proteínas. A – *Pool* das amostras de micélio crescido em glicose (GLU) e glicerol (GLY), utilizando 3 réplicas biológicas. B – Preparo do ambiente e de material para dar início a extração dos micélios através do protocolo de Pirovani (2009), com modificações.

Foram maceradas 5 g de micélio com almofariz e pistilo, contendo nitrogênio líquido e polivinilpirrolidona (PVP), até a mistura ficar em forma de pó. As amostras foram então transferidas para tubos de *eppendorff* de 2 mL, com repetições e ressuspendidas em ácido tricloroacético (TCA) 10% em acetona. Após a homogeneização por sonicação com resfriamento (4 pulsos de 5 s, amplitude de 70 %, com intervalos de 10 s), as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, 4 °C, por 15 min (*eppendorf centrifuge* 5417r). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido com TCA 10% em água. Logo após, as amostras foram homogeneizadas por sonicação (6 pulsos de 10 s, amplitude 70 %, com intervalos de 10 s) e centrifugadas a 14.000 rpm, 4 °C, por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado em acetona 80 % com solução de β-mercaptoetanol a 0,07 %. As amostras, foram centrifugadas a 14.000 rpm, 4 °C, por 15 min. O sobrenadante descartado e as amostras foram colocadas na capela por 30 min para a secagem do *pellet*. O *pellet* foi ressuspendido em SDS denso a 2 % contendo solução de β-mercaptoetanol a 0,07 % e homogeneizado através de sonicação (6 pulsos de 10 s, amplitude 70 %, com intervalos de 10 s). Após esse período foram adicionados 0,08 % de fenol na amostra. As amostras foram homogeneizadas, utilizando vórtex

por 2 min seguida de centrifugação a 14.000 rpm, 4 °C, por 15 min. Após a centrifugação, a fase superior foi transferida para um novo tubo, onde foi adicionado 5x o volume da amostra de acetato de amônio (0,1mM). As amostras foram armazenadas por 10 min a -80 °C e logo após, centrifugadas a 14.000 rpm, 4 °C, por 15 min. O sobrenadante foi descartado e foram feitas duas lavagens com acetato de amônio a 1M e duas lavagens com acetona 80 %. O *pellet* foi deixado na capela de fluxo laminar para secar. Depois de seco, as amostras foram ressuspendidas em 200 µL de uréia a 8 M e sonicada com 3 pulsos, de 5 s, amplitude de 40 % a intervalos de 10 s. As amostras foram armazenadas a -20 °C até o momento da utilização.

3.2.2 – Extração de proteínas do secretoma de Glicose e Glicerol

Para a extração de proteínas de ambos os secretomas, também foi realizado um *pool* de todas as amostras (respeitando a sua respectiva fonte de carbono), de modo a obter uma solução homogênea. Para extração, foram utilizados 20 mL de meio de cultura de glicose e glicerol, durante o tempo de 15 e 60 dias. As amostras de glicose e glicerol foram submetidas a extração de proteínas conforme o protocolo de Alvim et al. (2009) com modificações (Figura 12).

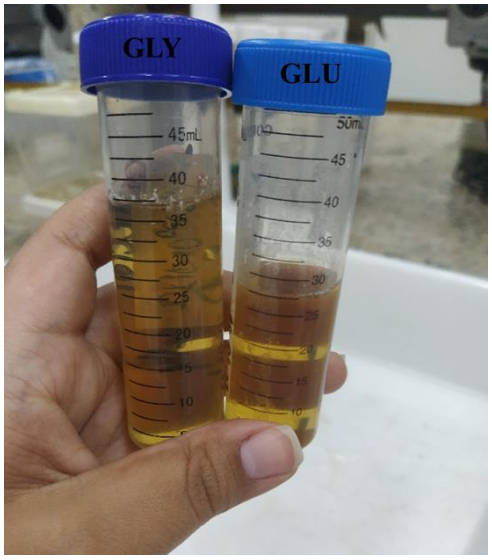

Figura 12 – Secretoma de glicose e glicerol em tubos *Falcon*. Foi realizado um *pool* dos secretomas de glicose (GLU) e glicerol (GLY), utilizando as 3 réplicas biológicas. Essas amostras foram utilizadas para a extração de proteínas, com o protocolo de Alvim (2009) com modificações (Arquivo Pessoal).

Para a extração de proteínas do secretoma, 20 mL do meio líquido, foram adicionados com 95 mL de TCA 10 % em água em um recipiente. A amostra foi dividida em 4 tubos *falcon* de 50 mL, com o conteúdo total de 28 mL por tubo, onde permaneceram por 12 h a -20 °C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, 4 °C, por 30 min (*eppendorf centrifuge* 5804). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado três vezes em solução

gelada de acetona 80 % e duas vezes com solução etanol 70 %. As amostras foram colocadas na capela por 2 h e após esse período o *pellet* foi diluído em 100 μL de ureia 8 M.

3.3 - Quantificação de proteínas totais

As proteínas obtidas através do micélio e do secretoma foram quantificadas com o 2D Quant Kit (*GE Healthcare Life Sciences*), seguindo as recomendações do fabricante. A curva padrão foi utilizada com diferentes concentrações de albumina de soro bovina (BSA), que serviu para gerar a curva padrão de dosagem para a quantificação das amostras. Tanto a curva, quanto as amostras foram preparadas em triplicata, usando microtubos do tipo *eppendorf* de 2 mL. Inicialmente, foi adicionado a todos os microtubos (padrão e amostras) 100 μL de solução precipitante. Logo após, foram adicionados 2 μL das amostras ressuspensas em tampão de reidratação e as concentrações correspondentes do padrão aos microtubos da curva, sendo brevemente homogeneizados em vortex. Posteriormente, foram adicionados 100 μL de solução co-precipitante a cada microtubos, seguido de homogeneização por inversão. Os microtubos foram centrifugados a 14.000 rpm, 4 ºC, por 15 min. Após a centrifugação, houve o descarte completo do sobrenadante. Ao *pellet* foram adicionados 20 μL de solução de cobre e 80 μL de água destilada e autoclavada, seguido de homogeneização em vortex, para dissolução do precipitado. Logo após, foram adicionados 200 μL do "reagente de cor" (reagente A + reagente B) em todos os *eppendorfs* e a solução formada foi incubada por 15 a 20 min a temperatura ambiente. Em seguida, as soluções foram transferidas para microplacas ELISA e submetidas à leitura em espectrofotômetro (480 nm), através do *SoftMax Pro*, gerando uma curva padrão utilizada para a quantificação em μg /μL das amostras de proteínas.

3.4 - Eletroforese em SDS-PAGE

Foram utilizadas 20 μg das proteínas extraídas do micélio e secretoma de *M. perniciosa*. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil-sulfato de sódio (SDS) a 12,5 %. Foi utilizado o marcador da *Invitrogen* 14-97 KDa e a minicuba (Omniphor), com géis de 8 x 10 cm seguindo o protocolo de Laemmli (1970). Os géis foram corados com *Comassie coloidal* a 0,08 % de acordo com Neuhoff et al. (1988).

3.5 - Espectrometria de massas

As amostras de micélio e secretoma referentes aos diferentes tratamentos foram padronizadas com base nas quantificações anteriores e foram submetidas a reação com tripsina

durante 16 h. Após este período, a solução contendo os peptídeos digeridos foi dessalinizada, utilizando ponteiras com resina C18 (10 µL; Millipore® Ziptips C18). Os peptídeos foram eluidos em 50 µL de solução contendo 75 % de acetonitrila, 25 % água e 0,1 % de ácido fórmico. Os peptídeos foram, então, submetidos à análise em um sistema de cromatografia líquida (*Agilent* 1290 *Infinity* II HPLC) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo/Tempo-de-Voo (*Agilent* 6545 LC/QTOF) (Figura 13A e B).

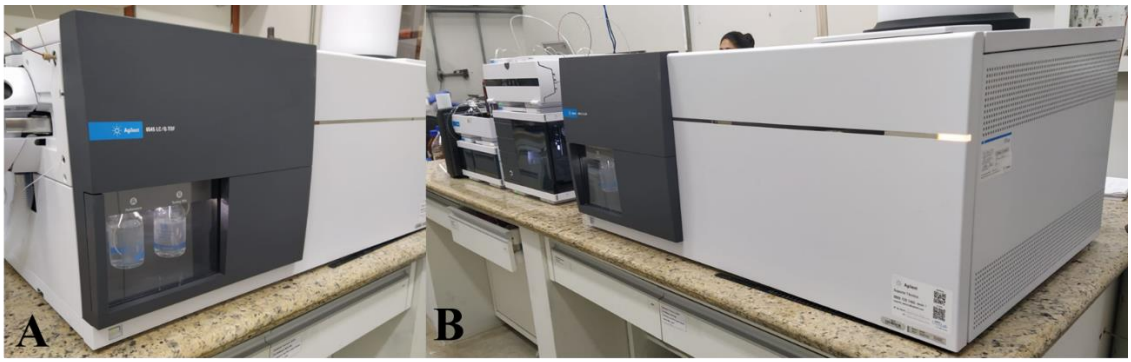

Figura 13 – A e B – Espectrômetro de massas do tipo quadrupolo/Tempo-de-Voo (*Agilent* 6545 LC/QTOF) do laboratório de proteômica do CBG/UESC.

As amostras foram separadas utilizando uma coluna de fase reversa (C18; *AdvanceBio Peptide Mapping* 2.1 x 250 mm; *Agilent*), mantendo uma temperatura de 55°C. Aplicou-se um gradiente de 20 min com as fases móveis A (H_2O e ácido fórmico a 0,1%) e B (acetonitrila e ácido fórmico a 0,1%). As porcentagens de fase B, ao longo do gradiente, foram de 5% a 35% (1-10 min.), 35% a 70% (11-14 min.), 70% a 100% (16 a 18 min.) e 100% (16-20 min). Além disso, foi programado um período final de 5 min para estabilização da coluna. Em seguida, as amostras foram injetadas em 3 réplicas técnicas (Figura 14). As amostras foram injetadas no quadrupolo, tempo de voo (QTOF) através de uma fonte do tipo *electrospray*, utilizando-se o modo de aquisição AutoMSMS, com seleção de no máximo 10 precursores por ciclo. Os parâmetros para a seleção dos precursores foram: *treshold* de 1000, 10.000 counts/espectro, restringência de pureza de 100%, corte de pureza de 30%, modelo isotópico peptídeos, preferência de carga de 2, 3, >3 e *unknown*. A energia de colisão (em V) foi configurada para ser aplicada de acordo com a fórmula:$(slope) * (m/z)/100 + Offset$, onde m/z representa a razão massa/carga do precursor e o *slope* e o *Offset* variam de 3,1 a 5 e de - 4,8 a 10, respectivamente, dependendo se a carga do precursor é de 2, 3, >3 ou desconhecida. Os parâmetros do instrumento utilizados foram: temperatura do gás de 325°C, fluxo de gás de 13 L/min, voltagem do capilar de 4000 V e voltagem do *skimmer* de 56 V. Nitrogênio gasoso foi utilizado para a colisão de dissociação induzida. O controle do instrumento (HPLC e QTOF) e

a configuração dos parâmetros foram realizados através do software *Agilent MassHunter Acquisition*.

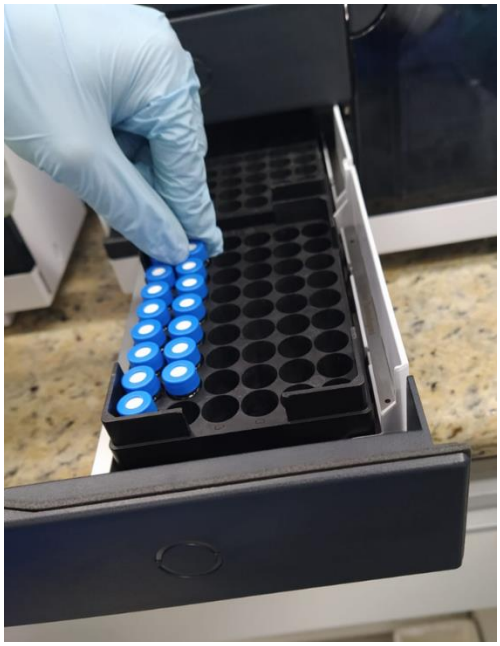

Figura 14 – Amostras de proteínas de micélio crescido em glicerol e glicose e de ambos os secretomas, sendo injetadas no espectrômetro de massas.

3.6 – Identificação dos peptídeos em bancos de proteína

Os espectros resultantes foram processados por triplicata para identificação de peptídeos, utilizando o *software Spectrum Mill* (Rev B.06.00.203 SP1; *Agilent*). Os parâmetros para extração de espectros foram: MSNoiseThreshold de 10 counts, modificações fixas de *carbamidomethylation*, precursor MH+ de 200 a 6000 Da, tolerânica de tempo de retenção de +/- 60 s, tolerância de m/z +/- 1,4 e carga precursora *find*. Após a extração dos espectros MS/MS, foi realizada a busca em banco de dados. O banco utilizado foi o de *Moniliophthora roreri* baixado do UniProt (https://www.uniprot.org), pois, este banco possui um maior número de proteínas identificadas do que o banco do *Moniliophthora perniciosa*. Os parâmetros para coomparação de espectros MS/MS no banco de proteínas foram: número máximo de clivagens perdidas: 4; modificações fixas: *carbamidomethylation* (C); modificações variáveis: *Oxidized methionine* (M), *pyroglutamic acid* (N-termQ), *deamidated* (N), *phosphorylated* S (S), *phosphorylated* T (T), *phosphorylated* Y (Y); intensidade de pico mínima combinada:10 %; e tolerância de massa do precursor: +/- 10 ppm. Os resultados da busca foram validados e filtrados, para aqueles que tiveram uma taxa de falso positivo (FDR) menor do que 1%. Os

resultados foram exportados no modo de *protein-protein comparision* no formato de arquivo MPP APR.

3.7 - Identificação de proteínas diferencialmente abundantes

As análises estatísticas para identificação das proteínas diferencialmente abundantes foram realizadas no *software Mass Profiler Professional* 15.1 (MPP; *Agilent*). A abundância das proteínas foi calculada através da mediana da abundância de peptídeos. Foi realizado um experimento para cada tratamento. Em cada experimento, foram comparados os resultados das triplicatas do controle com as triplicatas do tratamento correspondente. As proteínas foram filtradas por frequência de peptídeos, de acordo com o seguinte critério: retêm proteínas que aparecem em pelo menos 100% das triplicatas em pelo menos uma condição. A análise de significância estatística foi feito pelo Teste T não pareado (glicose vs. glicerol), o cálculo do *p-value* foi assintótico e a correção de multi-teste foi através do método Benjamini-Hochberg. Só proteínas que tiveram um *p-value*<0,05 e *fold-change*≥1,5 foram consideradas diferencialmente abundantes. A análise de componentes principais, o diagrama de *Venn* e o *heat map* foram gerados no mesmo *software*. Para o diagrama de *Venn* e para a análise de componentes principais, foram consideradas apenas as proteínas abundantes. Para o *heat map* foram contempladas apenas aquelas proteínas que estatisticamente satisfizeram os critérios de *p-value*< 0,05 e *fold change*≥ 1,5. Os parâmetros utilizados foram: valores de intensidade normalizados, distância métrica euclidiana e método de ligação *Ward*.

3.8 - Validação Biológica

A validação biológica foi realizada através de microinjeções com aproximadamente 1mL do secretoma do fungo crescido no tempo de 15 e 60 dias, com glicose e glicerol (Figura 15). Essa validação foi feita com o objetivo de verificar se os secretomas oriundos do crescimento em glicose e glicerol, teriam alguma influência sob as folhas, para assim, a amostra complexa ser submetida a espectrometria de massas, por isso, não foram realizadas etapas de teste previamente. Porém, segundo Alvim et al., (2009), testes realizados com *Nicotiana tabacum*, já demonstraram que a folha foi suscetível ao secretoma do fungo MP4145, crescido em glicose e glicerol, em um crescimento de 15 dias.

Figura 15 – Infiltração do secretoma de *M. perniciosa* nas folhas de *Nicotiana benthamiana* para a validação biológica.

Neste experimento, foram utilizadas folhas de *Nicotiana benthamiana*, mantidas em casa de vegetação (Figura 16). O secretoma (sem o micélio) foi infiltrado em 4 folhas diferentes para cada período do crescimento. O meio de cultura de 15 dias (sem crescimento de fungos) também foi infiltrado na folha para fins de controle, logo após, o secretoma de 15 dias de crescimento em glicose e glicerol, foi infiltrado cada um em uma folha. Utilizando 4 folhas, o mesmo procedimento foi realizado para o secretoma de 60 dias. O meio de cultura de 60 dias (sem crescimento de fungos), também foi infiltrado para fins de controle, logo após, o secretoma de 60 dias de crescimento de glicose e glicerol, foi infiltrado em cada folha. As amostras foram aplicadas em três pontos diferentes de cada folha, situando-se próximas da nervação peninérvea de folhas jovens. Todas as folhas foram infiltradas no mesmo dia, e foram avaliadas no tempo 0, 24 h, 48 h e 72 h, apenas as folhas infiltradas com o secretoma em que *M. perniciosa* cresceu durante 60 dias foi avaliado 7 dias após a aplicação.

Figura 16 – Plantas de *Nicotiana benthamiana* utilizadas no experimento, aclimatadas em casa de vegetação do CBG/UESC.

4.0 - RESULTADOS

4.1 - Validação Biológica

A validação biológica da capacidade dos secretomas em induzir morte celular em plantas, foi avaliada mediante a infiltração de amostras de cada secretoma em limbo foliar de *Nicotiana tabacum* e *Nicotiana benthamiana* (Figura 17). Foram infiltradas as amostras do secretoma de 15 e 60 dias de crescimento micelial. A partir da avaliação das folhas no tempo 0, constatou-se que a aplicação havia sido realizada, pois era possível identificar o conteúdo líquido injetado nas nervuras paralelinérveas (Figura 17), tanto no secretoma de 15 dias como no secretoma de 60 dias.

Figura 17 – Folhas de *Nicotiana tabacum* após a infiltração do secretoma de *M. perniciosa*. Setas indicam infiltração do secretoma no espaço intercelular do limbo foliar.

4.1.1 - Avaliação da atividade do secretoma com 15 dias de crescimento, injetado nas folhas

Não foram observadas alterações como encarquilhamento, necrose ou amarelecimento foliar após a infiltração do meio de cultura líquido contendo glicose ou glicerol (controle). Contudo, 24 h após a infiltração do secretoma de ambos os tratamentos em que o fungo cresceu por 15 dias, foi observado o aparecimento de manchas marrons e uma ligeira murcha nos locais da infiltração (Figura 18.A). Após 48 h, as folhas infiltradas começaram a apresentar clorose, sendo mais intensa nas folhas infiltradas com o secretoma glicose (Figura 18.B). Apesar da quantificação da área não ter sido realizada, após 72h, os pontos de necrose nas folhas começaram a surgir nas áreas infiltradas. Na folha com secretoma de glicerol, também foi possível observar um ponto de necrose fora da área em que fora aplicado o secretoma (Figura 18.C), na direção de ambas as nervuras (laterais e centrais).

Cabe ressaltar que a quantidade de proteínas infiltradas não foi a mesma em ambos os tratamentos, pois, através da visualização do gel (Figura 23), o extrato glicose apresentou-se mais concentrado do que o de glicerol. Sendo assim esse resultado indica que ambos os tratamentos apresentam em sua composição proteica uma maior quantidade de proteínas que induzem morte celular.

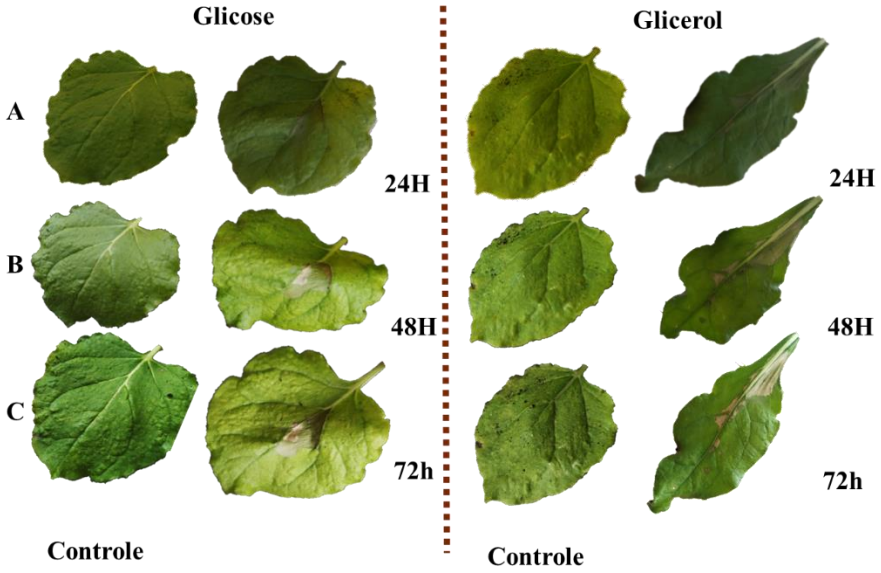

Figura 18 – Secretoma de *M. perniciosa* crescidos em meio contendo glicose ou glicerol (15 dias) que foram infiltrados no limbo foliar da folha e induziu necrose em folhas de *N. benthamiana*. Folhas representativas de 24h (A), 48h (B) e 72h (C) após infiltração do secretoma. Controle foram as folhas infiltradas apenas com o meio de cultura.

4.1.2 - Avaliação da atividade com secretoma com 60 dias de crescimento, injetado nas folhas

Após às 24h, observou-se que ambos os tratamentos induziram o aparecimento de manchas marrons nas folhas infiltradas. Ao se comparar a intensidade da coloração entre os tratamentos de 15 e 60 dias de crescimento, observa-se que os secretomas de 60 dias induziram o aparecimento de regiões mais escuras em um mesmo período de tempo. Observou-se também que as folhas apresentaram encarquilhamento significativo após o período de 24h. Apenas as folhas infiltradas com o secretoma glicerol apresentou clorose acentuada nessas primeiras horas (Figura 19.A). Após 48h da infiltração foi possível observar pontos de necrose e encarquilhamento foliar em ambos os tratamentos. Contudo, um encarquilhamento mais acentuado foi observado mediante infiltração do secretoma glicose. As folhas infiltradas com secretoma glicerol apresentaram-se mais cloróticas do que as infiltradas com secretoma glicose, (Figura 19.B). Após 72h, foi possível observar que ambos os tratamentos induziram necrose intensa nas áreas infiltradas. Pontos de necrose foram observados em outras áreas além das infiltradas. Foi observado também que o processo de clorose das folhas infiltradas com secretoma de glicose começou nas áreas adjacentes as áreas de necrose. Contudo, nas folhas infiltradas com glicerol a clorose foi na folha completa. Em ambos os tratamentos, observou-se que o encarquilhamento foliar se manteve (Figura 19.C). Decorridos os 7 dias, a folha contendo secretoma de glicose foi tomada pela clorose com o tecido necrosado, chegando até a parte mais

externa da folha. Também haviam outros pontos de necrose em áreas em que o secretoma não foi aplicado, por conta disso, a folha também apresentou uma redução no tamanho. No meio contendo glicerol, a necrose tomou conta da maior parte do eixo interno da folha. Aproximadamente 85% do tecido apresentou necrose. Além disso, a parte que ainda não havia necrosado estava com uma cor amarelada que se aproximava de um tom marrom. A folha também se apresentou mais encarquilhada, sendo a grande maioria em sua parte interna, tornando-se um tecido inviável para processos como a fotossíntese (Figura 19.D).

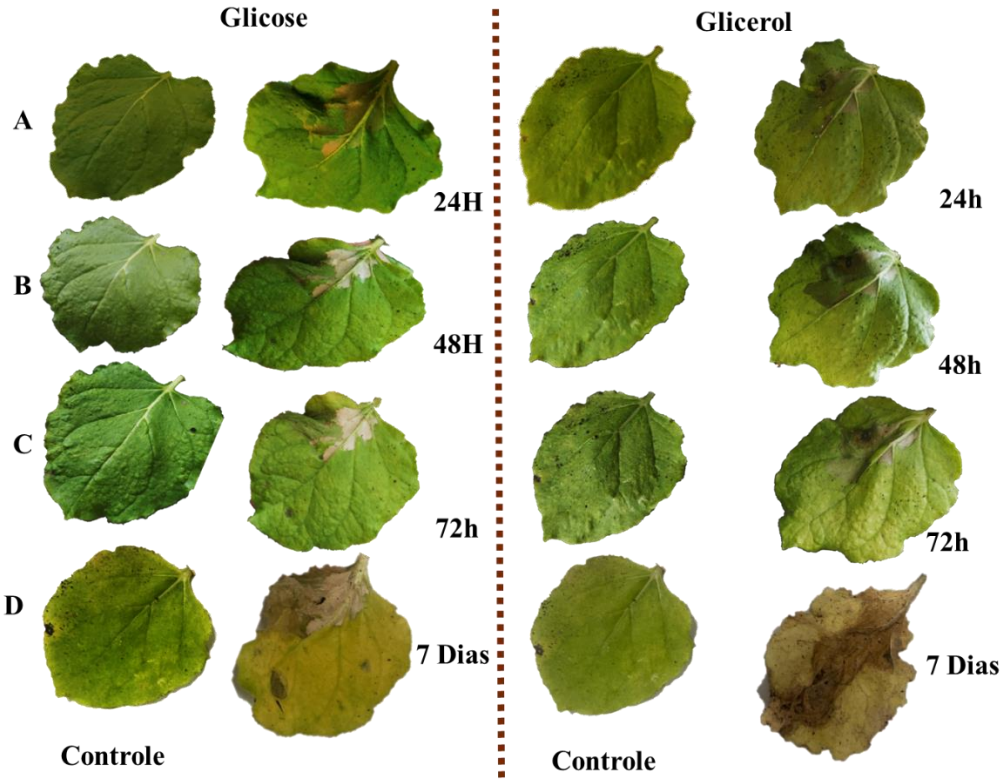

Figura 19 – Folhas de *N. benthamiana* infiltradas secretoma de *M. perniciosa* crescidos em meio contendo glicose ou glicerol (60 dias), mostrando a indução de necrose no limbo. Folhas representativas de 24h (A), 48h (B) e 72h (C) após infiltração do secretoma. Controle foram as folhas infiltradas apenas com o meio de cultura.

4.2 - Crescimento dos fungos

Os micélios de *M. perniciosa* crescidos durante 15 dias sob fontes de carbono diferentes (glicose e glicerol), em meio líquido mineral foram separados de ambos os seus secretomas, para que as proteínas fossem extraídas. No momento de fazer a separação dos micélios, foi possível perceber que havia diferenças entre eles, ainda nas magentas (Figura 21). Os micélios foram transferidos das magentas para as placas de *petri*, para que fosse realizado um *pool* das amostras. Visivelmente, foi possível perceber que havia uma diferença de massa

micelial entre eles (Figura 20). O micélio crescido na presença de 20 mM de glicose, tinha um crescimento maior (Figura 20 A) que o micélio crescido a 20 mM de glicerol (Figura 20 B).

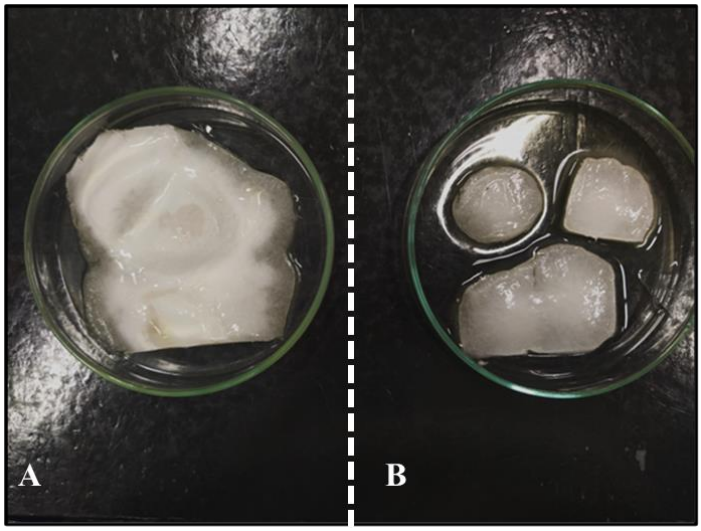

Figura 20 – Glicose e glicerol induzem um aspecto diferencial em micélios de *Moniliophthora perniciosa*. A- Micélio de *M. perniciosa* crescido por 15 dias na presença de glicose. B – Micélio de *M. perniciosa* crescido por 15 dias na presença de glicerol.

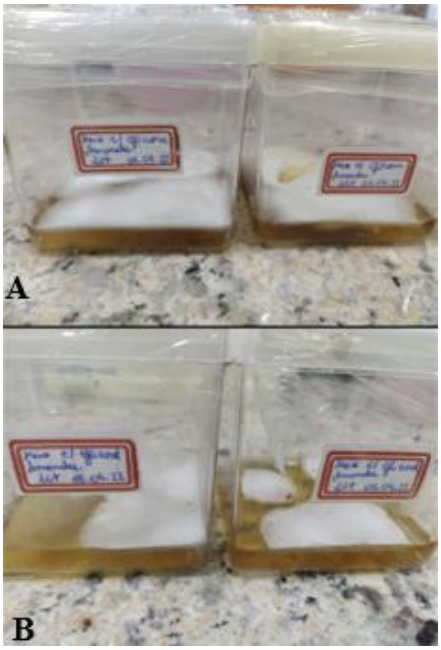

Figura 21 – *M. perniciosa* crescido em diferentes fontes de carbono: Glicose (A) e Glicerol (B) em um período de 15 dias em crescimento controlado.

Diferenças também foram observadas em relação ao meio líquido. Observou-se que nas 3 réplicas em que o micélio cresceu na presença de glicose, coletou-se uma média de aproximadamente 54 % de meio líquido após os 15 dias de crescimento micelial (o volume inicial foi de 50 mL). Contudo, nas 3 réplicas em que o micélio cresceu na presença de glicerol, foram coletados uma média de 74 % de meio líquido (Figura 22). Ou seja, houve um maior consumo do meio, pelo micélio de glicose, visto que todas as magentas foram vedadas da

mesma maneira e os organismos permaneceram em condições ambientais iguais. A única diferença entre os mesmos foi a fonte de carbono. O meio de cultura líquido coletado, foi utilizado para extração de proteínas secretadas do micélio. Depois de 60 dias de crescimento do micélio, foi feito um pool de 2 réplicas biológicas de secretoma, que estavam em BOD. Essas amostras foram utilizadas, pois, nas amostras com 15 dias de crescimento não foi possível obter uma boa quantidade de proteínas para posteriores análises no espectrômetro de massas (Figura 22).

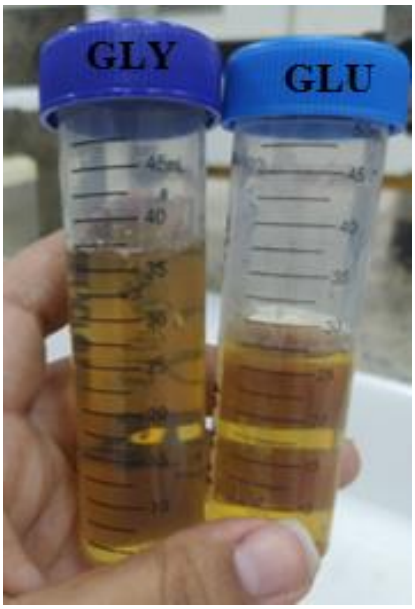

Figura 22 – Glicose (**GLU**) e Glicerol (**GLY**) utilizam de maneira diferente o meio de cultura em diferentes fontes de carbono. O primeiro tubo *Falcon* (**GLY**), representando o secretoma de glicerol contendo 37mL de meio e o segundo tubo *Falcon* (**GLU**), representando o secretoma glicose contendo 27mL de meio. A foto representa o crescimento do meio durante 15 dias.

4.3 – Qualificação da extração de proteínas do micélio e secretoma

O perfil proteico secretado e micelial do *M perniciosa* foi revelado após as proteínas serem separadas em gel de poliacrilamida seguido de coloração com *comassie coloidal* (Figura 20). As análises no gel de poliacrilamida, revelou que as proteínas se mostraram integras e distribuídas entre 97 e 14 KDa. Contudo, a maioria das proteínas ficaram compreendidas entre 30 a 97 KDa. Não foram observadas diferenças no perfil proteico micelial entre glicose e glicerol.

A análise no gel de poliacrilamida revelou que de fato a concentração proteica dos secretomas do *M. perniciosa* crescido por 15 dias em meio de cultura, foi pouca e insuficiente para a análise via espectrometria de massas (Figura 23; Colunas 3 e 4). Contudo, uma maior concentração proteica com boa qualidade das proteínas secretadas foi obtida nas amostras após 60 dias de crescimento (Figura 23; Colunas 5 e 6). A análise desses secretomas em gel, revelou

um perfil composto por proteínas distribuídas majoritariamente acima de 30KDa, mas com presença de bandas proteicas com acúmulo diferente entre os tratamentos. Nas amostras de glicose, encontramos tanto no micélio como no secretoma uma quantidade superior de proteínas do que no glicerol.

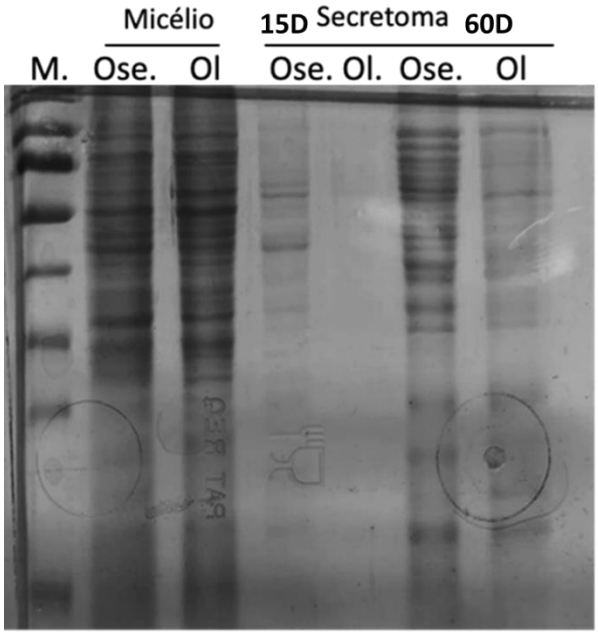

Figura 23 – Perfil eletroforético das proteínas miceliais e secretadas de *M. perniciosa*. M- Marcador de peso molecular de 97 e 14KDa. Proteínas miceliais de *M. perniciosa* crescido em meio contendo glicose (**Micélio – Ose**) ou glicerol (**Micélio - Ol**) e secretadas do fungo crescido por 15 dias (**15D - Ose**.; **15D Ol**) ou 60 dias em meio contendo glicose **(60D - Ose**.) ou glicerol (**60 D - Ol**) foram separadas em gel SDS-PAGE 12,5%.

4.4 – Identificação de proteínas do micélio e secretoma de *M. perniciosa*

A análise de proteínas do micélio via espectrometria de massas procedeu-se com apenas o micélio crescido em 15 dias. Nesta amostra, identificou-se 1.135 proteínas miceliais de *M. perniciosa* crescido em meio contendo glicose, sendo 387 proteínas ainda descaracterizadas (38,7 %). No micélio contendo glicerol, foram identificadas 273 proteínas, sendo 64 delas não caracterizadas (23,4 %).

Levando em consideração as proteínas diferencialmente expressas em cada tratamento, em ambos os micélios das diferentes fontes de carbono, foram encontradas proteínas oxiredutases, proteínas ribossomais, proteínas de ligação de DNA/RNA, hidrolases, proteínas ligadas a biossíntese, liases, proteínas de resposta ao estresse, ligases, transporte de íons, ligação de metais, proteínas desconhecidas, bem como, outras proteínas ligadas a outros processos celulares e moleculares. Na tabela 1, é possível verificar o quantitativo dessas proteínas em cada fonte de carbono, através de porcentagem. Na figura 24, é possível visualizar

a quantidade de proteínas identificadas nesse tipo de análise, bem como as funções identificadas em cada tratamento.

A análise da função proteica de outras proteínas que não foram selecionadas como diferencialmente expressas, mostrou que independente da fonte de carbono utilizada para o crescimento micelial, proteínas relacionadas ao estresse, hidrolases e peroxidases foram identificadas. No micélio crescido em glicerol, foi possível detectar proteínas exclusivas que estão relacionadas com o ciclo celular e até mesmo pequenas proteínas relacionadas com a ativação de "SnRNA". Já no micélio de glicose, foi possível observar uma maior quantidade de proteínas voltadas para o metabolismo de carboidratos.

Nas amostras de ambos os secretomas, utilizou-se apenas o secretoma de 60 dias. Na amostra contendo glicose, foi possível identificar 697 proteínas, sendo 341 proteínas não caracterizadas (48,9 %). Enquanto no secretoma de *M. perniciosa* crescido em o glicerol 533 proteínas foram identificadas, sendo 307 ainda não são caracterizadas (57,5 %).

Em ambos os secretomas foram encontradas diferentes proteínas relacionadas com o processo de patogenicidade, sendo a proteína "Killer kp4" (presente na glicose) mais abundante e a "PR1-like" (presente no glicerol) menos abundante. Em ambos os secretomas foram encontradas proteínas relacionadas com oxiredutases, hidrolases, proteínas de membrana, proteínas não caracterizadas e proteínas relacionadas com outros mecanismos celulares e moleculares (Figura 24). Na tabela 2, é possível verificar o quantitativo dessas proteínas em cada fonte de carbono, através de porcentagem.

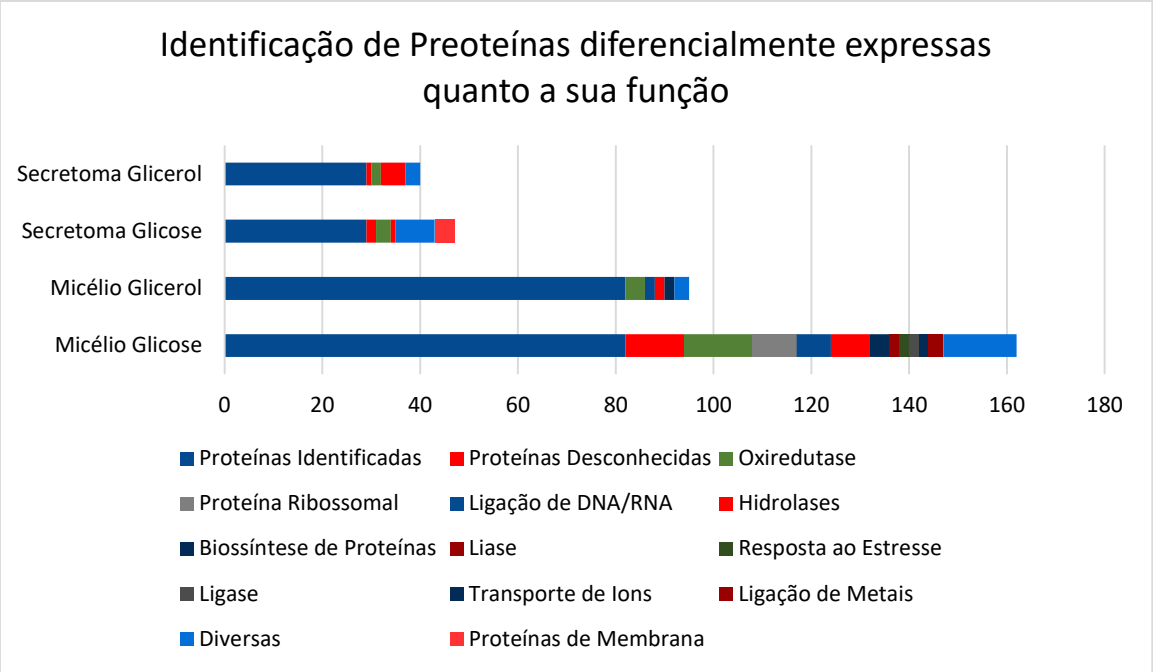

Figura 24 - Representação das proteínas identificadas na análise de proteínas diferencialmente expressas, onde cada cor indica o quantitativo de proteínas segundo sua função em cada tratamento (Micélios com crescimento de 15 dias e Secretomas com crescimentos de 60 dias).

4.5 - Identificação de proteínas diferencialmente abundantes

As proteínas que foram expressas em abundância e frequência, passaram pelo teste T não pareado, fazendo comparações entre Micélio de Glicose X Micélio Glicerol e Secretoma Glicose X Secretoma Glicerol. As proteínas diferenciais, foram selecionadas com base no *fold change* de ≥1,5 e $p<0,05$. Essas proteínas são representadas na figura 22, formando um perfil com proteínas identificadas (pontos cinzas) e proteínas diferenciais (pontos azuis e vermelhos). Em relação ao *volcano plot* do micélio, um total de 1408 proteínas identificadas 82 são diferenciais no tratamento (Figura 25 A). Já no *volcano plot* do secretoma, um total de 1.230 proteínas foram identificadas, enquanto 29 foram diferenciais (Figura 25 B).

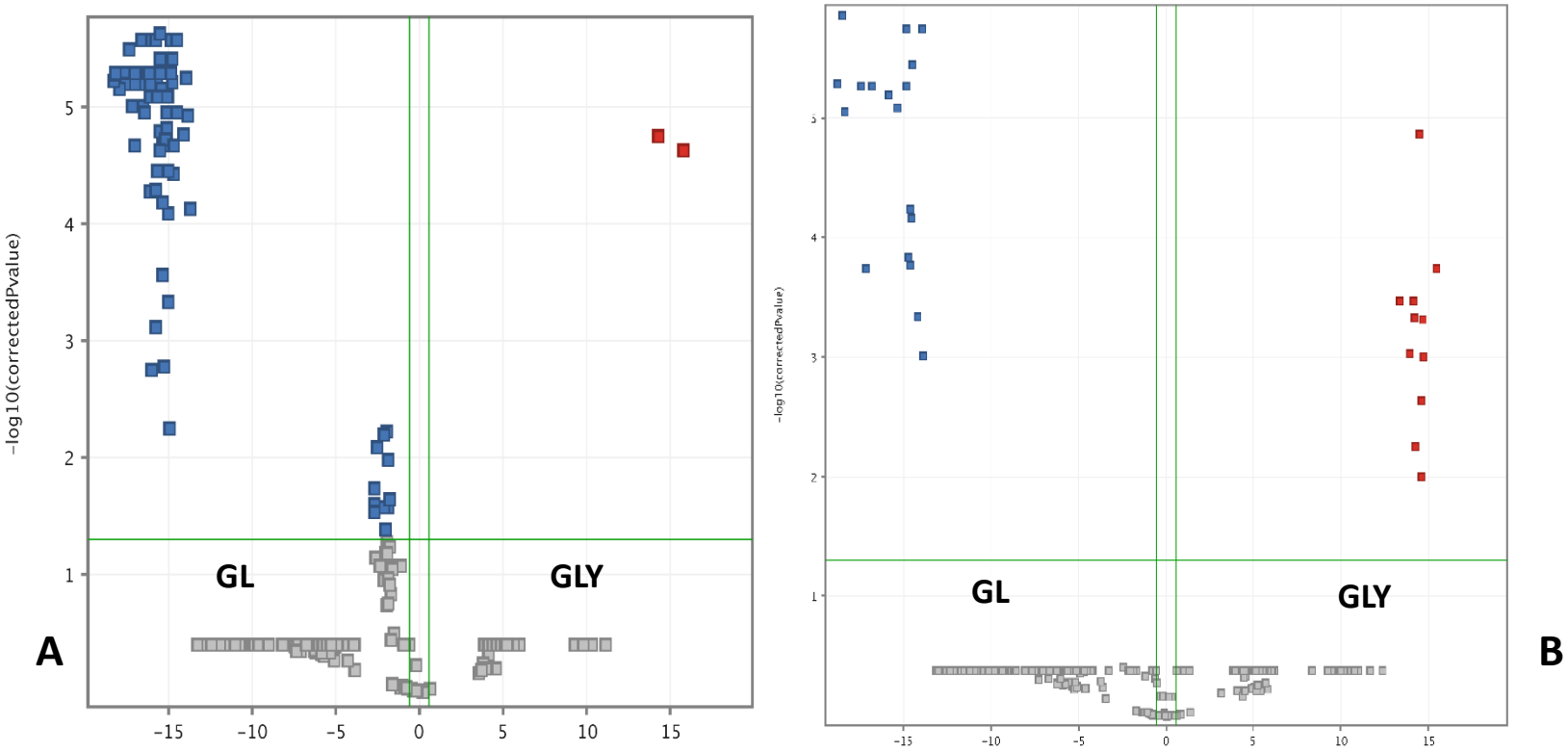

Figura 25 – *Volcano plot*, comparando cada tratamento, conforme as proteínas de significância (representadas na parte superior do gráfico em azul e vermelho). A – Comparação do micélio glicose com micélio glicerol. B – Comparação do secretoma de glicose, com secretoma de glicerol. Os pontos em cinza indicam as proteínas que não possuíram significância estatística para este trabalho.

Ainda na análise de proteínas que foram diferencialmente expressas, através do *diagrama de Venn* (Figura 26), foi possível identificar as proteínas exclusivas do micélio glicose, micélio glicerol, secretoma glicose e secretoma glicerol, bem como, as proteínas que foram expressas em ambos os micélios/secretomas. Como podemos observar, nos micélios foram identificadas um total de 82 proteínas abundantes enquanto no micélio de glicose foram obtidas uma maior quantidade de proteínas exclusivas (69) e no micélio de glicerol, foram encontradas poucas proteínas exclusivas (2), portanto, algumas proteínas foram expressas nos dois micélios (11). Já nos secretomas, foram identificadas um total de 29 proteínas abundantes e não foram encontradas proteínas expressas nos dois meios. Porém, o secretoma de glicose apresentou proteínas exclusivas (18) e o secretoma de glicerol também (11).

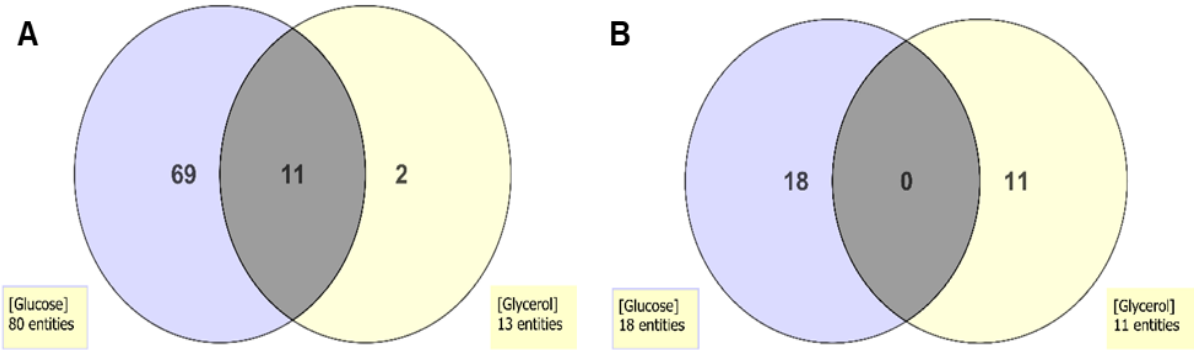

Figura 26 – Diagrama de *Venn* demonstrando a quantidade de proteínas que foram exclusivas de cada tratamento e na intersecção, a quantidade de proteínas presentes nos dois tratamentos. A- Micélio Glicose x Micélio Glicerol. B- Secretoma Glicose x Secretoma Glicerol

As proteínas diferencialmente abundantes no micélio e secretoma de *M. perniciosa* presentes nas duas fontes de carbono, são descritas nas duas tabelas a seguir, com base nas proteínas diferencialmente abundantes. Essas proteínas estão descritas na Tabela 1 (Micélio) e Tabela 2 (Secretoma) com nível de abundância, código de acesso, nome, número, espectro, número de peptídeos, cobertura, ponto isoelétrico, massa, e abundância em cada tratamento.

Tabela 1 – Proteínas diferencialmente abundantes no Micélio de Glicose e no Micélio de Glicerol, quanto ao nome, espectro, ID de acesso no Banco UniProt, abundância em cada fonte de carbono, abundância relativa, número de peptídeos únicos, cobertura, ponto Isoelétrico e massa.

	Espectro	Acesso	Glicose	Glicerol	Abundância Relativa	Nome da Proteína	Número de peptídeos únicos	Cobertura	Ponto Isoelétrico	Massa
Oxirredutase										
1	26	V2X597	16,27	0.0	↑	Fumarate reductase	5	7,2	5,13	0,9
2	10	V2X754	15,71	0.0	↑	2-nitropropane dioxygenase	2	10,1	9	0,4
3	9	V2YSK6	15,07	0.0	↑	Nadp-dependent leukotriene b4 12-hydroxydehydrogenase	1	3,1	6,99	0,2
4	10	V2XUP8	16,13	0.0	↑	Acyl-dehydrogenase	2	7,3	9,37	-0,4
5	6	V2XAC1	15,56	0.0	↑	Superoxide dismutase	1	3,9	6,44	-2,5
6	11	V2WW51	16,92	0.0	↑	Nadh:flavin oxidoreductase nadh oxidase	1	3,3	6,02	0,6
7	5	V2WIU4	15,54	0.0	↓	Glutathione reductase	1	2,5	6,66	0,6
8	6	V2Y4B0	14,89	0.0	↑	Short-chain dehydrogenase reductase sdr	1	2,6	9,12	1,4
9	3	V2XIG0	17,53	0.0	↓	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	1	2	8,31	0,3
10	6	V2XVD6	18,26	0.0	↑	Cytochrome c oxidase subunit 9, mitochondrial	1	15,2	9,82	7,4
11	6	V2XKJ2	17,07	0.0	↑	Alcohol dehydrogenase	1	8,3	9,52	0,2
12	27	V2XBH5	16,18	14,06	↑	Formate dehydrogenase	5	18,7	6,28	3,1
13	53	V2X3B6	16,09	14,21	↑	Catalase	6	16,5	6,92	1,2

14	7	V2X429	17,25	14,68	↑	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	7	20,2	7,07	1,3
15	5	V2YQQ7	0.0	15,68	↓	Putative gmc oxidoreductase	1	3,1	6,16	-1,7
Proteína Ribossomal										
16	6	V2XJ37	14,87	0.0	↑	60s ribosomal protein l3	4	10,3	10,3	1
17	15	V2WD68	15,50	0.0	↑	Ubiquitin	2	20,3	10,04	1,4
18	8	V2WVU3	15,77	0.0	↑	Ribosomal protein l12	3	21,8	9,1	1,7
19	24	V2XES3	14,58	0.0	↑	60s ribosomal protein l2	4	15,6	11,3	1
20	7	V2XW17	15,53	0.0	↑	40s ribosomal protein s23	2	3,8	6,22	6,7
21	6	V2XKQ8	15,41	0.0	↑	40S ribosomal protein S25	1	9,7	10,43	1,8
22	5	V2XZE0	16,37	0.0	↓	60S ribosomal protein L13	1	8,1	11,14	1,5
23	6	V2Y1R6	13,69	0.0	↑	60s ribosomal protein l28	1	4,1	10,92	-1,5
24	3	V2X674	14,16	0.0	↓	60s ribosomal protein l27	1	5,4	10,43	2,2
Ligação de DNA/RNA										
25	4	V2XNR7	18,78	16,05	↓	Replication protein A subunit	1	0,4	6,66	0,6
26	7	V2W9C8	14,72	0.0	↑	Histone H2A	1	5	9,99	-2,6
27	6	V2X0L5	15,19	0.0	↑	Histone H4	1	12,6	11,36	-3,4
28	6	V2XW47	14,54	0.0	↑	Septin	2	4,3	6,07	1,3
29	5	V2XGV6	14,97	0.0	↓	Glycine-rich rna binding protein	2	17,3	5,66	-0,9

30	11	V2XNU6	15,14	0.0	↑	Tubulin beta chain	2	4,2	4,8	3,9
31	11	V2YMW6	16,08	0.0	↑	Nad binding dehydrogenase	3	11,5	5,89	1
32	6	V2XNK8	0.0	14,19	↑	Tubulin alpha chain	1	3,1	5	1,5
Hidrolase										
33	54	V2Y8T8	16,45	14,29	↑	Adenosylhomocysteinase	8	27,5	6,02	0,7
34	17	V2WVN7	15,39	13,57	↑	Inorganic diphosphatase	3	12,3	5,45	5,3
35	3	V2YVT3	18,22	0.0	↓	ATP-dependent DNA helicase CHL1	1	2,3	9,18	7,8
36	4	V2Y9N2	15,14	0.0	↓	Chitin deacetylase	1	4	6,65	2,8
37	5	V2XWF1	16,16	0.0	↓	Protein phosphatase 2c	1	2,1	6,8	5,8
38	6	V2XA17	15,40	0.0	↑	Vacuolar protease a	1	2,4	4,91	0,8
39	16	V2XCT2	16,38	0.0	↑	Cysteineproteinase (Fragment)	3	6,5	5,15	1,4
40	5	V2WEI0	14,83	0.0	↓	Carbohydrate-binding module family 12 protein	2	1,06	6,07	0,1
Biossintese de Proteinas										
41	122	V2X610	16,34	14,42	↑	Elongation factor 1-alpha	16	39,1	9,35	0,6
42	118	V2YEI1	15,93	13,94	↑	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	16	28,1	6,62	0,3
43	3	V2YDU4	18,22	0.0	↓	Glutamine synthetase	1	3,6	6,32	-0,2
44	45	V2XIT6	15,38	0.0	↑	Elongation factor 2	9	14,3	6,24	2,6

Liase										
45	18	V2Y3K3	16,53	0.0	↑	Fructose-bisphosphate aldolase	2	11,1	5,91	-0,8
46	5	V2XKA8	15,46	0.0	↓	Urea hydro-lyase cyanamide	1	3,9	5,76	0
Resposta ao Estresse										
47	8	V2XAR9	14,71	0.0	↑	Heme peroxidase	2	1,8	6,41	-3,7
48	58	V2XZ71	15,50	0.0	↑	Heat shock protein	9	15,4	5,11	6,7
Ligase										
49	3	V2XU70	15,15	0.0	↓	Glutamine synthetase	1	3,6	6,32	-0,2
50	4	V2XCZ6	15,27	0.0	↓	HECT-type E3 ubiquitin transferase	3	1,2	4,96	2,3
Transporte de ions										
51	3	V2XI98	15,55	0.0	↓	Tandem pore domain k+ channel	1	1,3	9,13	-1,8
52	8	V2XIR4	15,03	0.0	↑	Voltage-gated potassium channel beta-2 subunit	1	38	7,09	-1,4
Ligação de metais										
53	4	V2XAK2	15,80	0.0	↓	1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase	4	2,3	6,38	7,3
54	6	V2X699	15,11	0.0	↑	Phosphoglucomutase	1	1,8	6,06	-0,1

55	1	V2XCP5	17,22	0.0	↓	Cytochrome p450	1	3,7	8,44	3,4
Proteínas não caracterizadas										
56	3	V2WUP8	15,69	0.0	↓	Uncharacterized protein	1	4,7	9,25	1,9
57	3	V2W8N6	17,07	0.0	↓	Uncharacterized protein	1	14,2	10,13	5,3
58	3	V2YYP3	17,92	0.0	↓	Uncharacterized protein	1	15,2	9,82	5,3
59	4	V2XZ37	17,59	0.0	↓	Uncharacterized protein	1	1,5	6,09	0,1
60	4	V2X979	17,67	0.0	↓	Uncharacterized protein	1	4,5	6,42	0
61	8	V2XBX5	17,01	0.0	↑	Uncharacterized protein	1	6,5	8,96	9,7
62	3	V2WNH6	17,59	0.0	↓	Uncharacterized protein	1	3,2	9,8	-2,2
63	3	V2XE81	15,73	0.0	↓	Uncharacterized protein	2	4,3	10,42	5
64	3	V2WGC4	13,89	0.0	↓	Uncharacterized protein	1	2	5,68	1,8
65	14	V2WLI6	16,01	0.0	↑	Uncharacterized protein	1	5,3	5,13	1,6
66	9	V2WFT1	15,82	0.0	↑	Uncharacterized protein	1	4,7	5,71	-0,5
67	8	V2W827	16,13	0.0	↑	Uncharacterized protein	1	3,1	6,35	0,3
Diversos										
68	2	V2Y0P7	14,01	0.0	↓	F-box domain-containing protein	1	1,2	9,36	0,7
69	5	V2XFK6	15,03	0.0	↓	Importin subunit alpha	1	2,6	5,16	-2
70	4	V2XEA0	17,34	0.0	↓	Ny-ren-24 antigen	1	0,7	5,97	2,3

71	5	V2X4H2	15,07	0.0	↓	Acetyl-acetyl transferase	2	6,8	8,45	1,2
72	12	V2XPG3	16,59	0.0	↑	Tubulin alpha chain	2	5,1	5,17	-0,1
73	8	V2XU89	16,62	0.0	↑	Glycosyltransferase 2	1	1,5	6,34	-2,5
74	5	V2XTW1	15,83	0.0	↓	Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase	2	19	6,95	9,3
75	12	V2YY40	16,45	0.0	↑	Nad dependent epimerase dehydratase family protein	1	6,5	6,18	-2,4
76	3	V2XUY6	16,10	0.0	↓	DNA polymerase kappa	1	2,3	8,52	-9,7
77	3	V2WER0	16,24	0.0	↓	Transposase	1	2,2	6,08	-3,1
78	5	V2XM61	14,78	0.0	↓	Glucose-6-phosphate isomerase	2	4,5	6,17	1,6
79	6	V2XA64	15,73	0.0	↑	O-methyltransferase family 3	1	3,8	5,64	0,1
80	5	V2XP97	18,43	15,71	↓	Aldo keto reductase	1	1,6	5,67	1,4
81	5	V2XNX0	20,29	17,50	↓	Ectomycorrhiza-regulated protein	1	1,9	6,9	0,9
82	50	V2XFE5	16,01	13,88	↑	ADP/ATP translocase	7	23,3	9,91	1,5

Tabela 2 – Proteínas diferencialmente abundantes no Secretoma de Glicose e Secretoma de Glicerol, quanto ao nome, espectro, ID de acesso no Banco UniProt, abundância em cada fonte de carbono, abundância relativa, número de peptídeos únicos, cobertura, ponto isoelétrico e massa

Linha	Espectro	Acesso	Glicose	Glicerol	Abundância Relativa	Nome da Proteína	Número de peptídeos únicos	Cobertura	Ponto Isoelétrico	Massa
Oxirredutase										
1	13	V2YHY1	14,56	0.0		FAD-bindingdomain-containingprotein	3	6,0	4,6	2
2	2	V2XAN4	14,21	0.0		Cytochrome p450	2	7,2	6,41	10,8
3	7	V2X687	17,43	0.0		Glutamate synthase (NADH)	1	1,3	6,39	-7,2
4	24	V2XEX2	0.0	14,43		Copper radical oxidase	6	10	6,85	1,9
5	8	V2WAZ5	0.0	14,21		Putative fad dependent oxidoreductase	3	8,1	4,99	0
Hidrolase										
6	5	V2XNI9	14,63	0.0		Peptide hydrolase	2	2,4	6,6	0,5
7	10	V2XFA5	0.0	14,69		Cutinase	2	11,8	5,47	0,5
8	6	V2XME1	0.0	14,17		Peptide hydrolase	2	2,9	4,96	2,2
9	6	V2YPS3	0.0	14,56		Glucoamylase	2	2,2	5,68	0
10	7	V2WWU3	0.0	14,10		Glycoside hydrolase family 3 protein	2	3	5,27	1

11	4	V2WW67	0.0	13,34	Neutral protease 2	1	2,9	4,67	1,4
Proteína de membrana									
12	10	V2XJ06	15,38	0.0	Membrane autotransporter barrel domain protein	2	3,5	4,8	0,5
13	5	V2XWS4	15,89	0.0	Duf1339 domain protein	1	1,3	5,77	2,4
14	3	V2WC08	17,16	0.0	DUF6535 domain-containing protein	1	3,1	5,81	-4,8
15	3	V2XYF2	18,84	0.0	Membrane glycoprotein spo14	1	5,3	9,26	6,2
Proteínas não caracterizadas									
16	3	V2YL98	13,95	0.0	Uncharacterized protein	1	0,8	6,13	0,6
17	3	V2WR80	18,51	0.0	Uncharacterized protein (Fragment)	1	2,4	5,44	6,6
18	5	V2WYQ4	0.0	15,42	Uncharacterized protein	2	7,2	4,66	0,1
Diversos									
19	19	V2YEP6	14,87	0.0	Arylsulfatase	3	4,7	5,09	-3,5
20	15	V2WUX2	14,66	0.0	Chitin deacetylase	2	11,2	6,65	0,7

21	5	V2XUD9	14,77	0.0	Pleiotropic drug resistance abc transporter	2	1,5	6,49	0,5
22	8	V2Y5R8	14,83	0.0	Chitin synthase (Fragment)	1	6,1	5,03	-2,1
23	19	V2X8U4	13,92	0.0	Arylsulfatase	3	47	5,09	1
24	5	V2XJY9	14,50	0.0	Killer kp4	1	1,03	8,29	3,9
25	3	V2XMG0	18,40	0.0	Indole-3-glycerol-phosphate synthase	1	7,6	6,46	0,6
26	2	V2YM21	16,81	0.0	F-box domain-containing protein	2	5,7	6,67	-9,3
27	17	V2XFU1	0.0	13,90	Peptidase s41 family protein	6	11,4	4,74	2,1
28	6	V2WT89	0.0	14,57	Extracellular triacylglycerol lipase	1	4,2	5,28	0
29	3	V2YV50	0.0	14,67	Ymr244c-a-like protein	1	13,5	8,01	-2

4.6 - Nível diferencial de abundância das proteínas

Todas as proteínas dos sois tratamentos foram submetidas a análise de nível de abundância. Foram selecionadas como proteínas diferencialmente abundantes, as que possuiam *fold change* de ≥1,5 e $p<0,05$. Através da seleção dessas proteínas, foi plotado um *heat map* com a análise de *clustering*, e o nível de abundância das proteínas de cada grupo, sendo classificadas como mais abundantes (*up*) e menos abundantes (*down*). No micélio de glicose e glicerol, foram encontradas 82 proteínas (Figura 27), enquanto no secretoma de glicose e glicerol foram 29 (Figura 28) As proteínas representadas pela cor azul, indicam que não foram encontradas naquele tratamento, ou seja, significa que aquela proteína não foi encontrada na fonte de carbono que está sendo representada. Já as proteínas representadas em vermelho, indicam que aquela proteína esta presente no tratamento. Quanto mais intensa a cor vermelha, maior a abundancia da proteína.

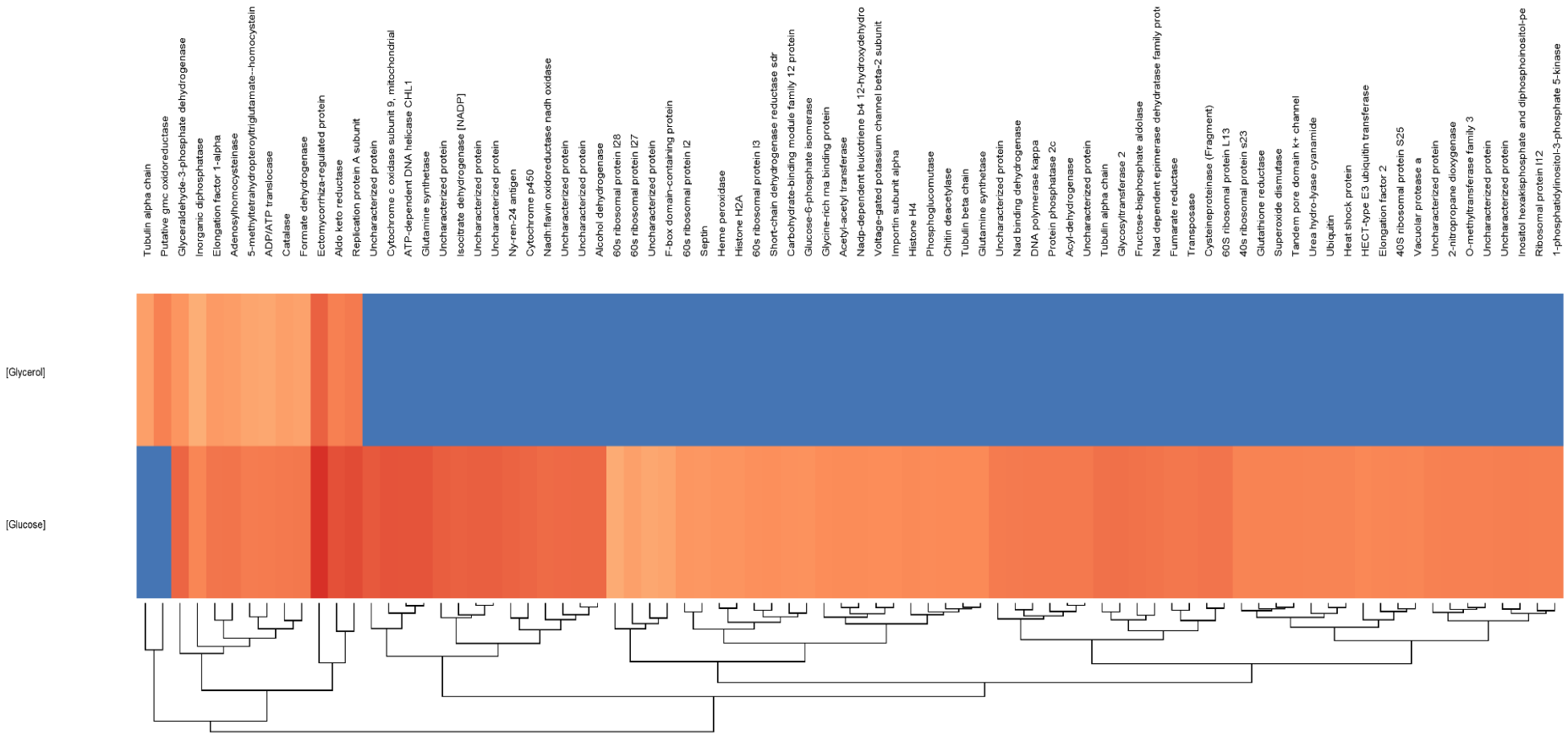

Figura 27 – *Heat Map*, representando o nível de abundância das proteínas diferenciais em cada tratamento considerando um *p-value*<0,05 e um *fold-change*≥1,5. Em vermelho, indicando abundância (*up*) e em azul, indicando ausência (*down*). A parte superior corresponde ao Micélio com Glicerol, e a parte inferior, Micélio com Glicose.

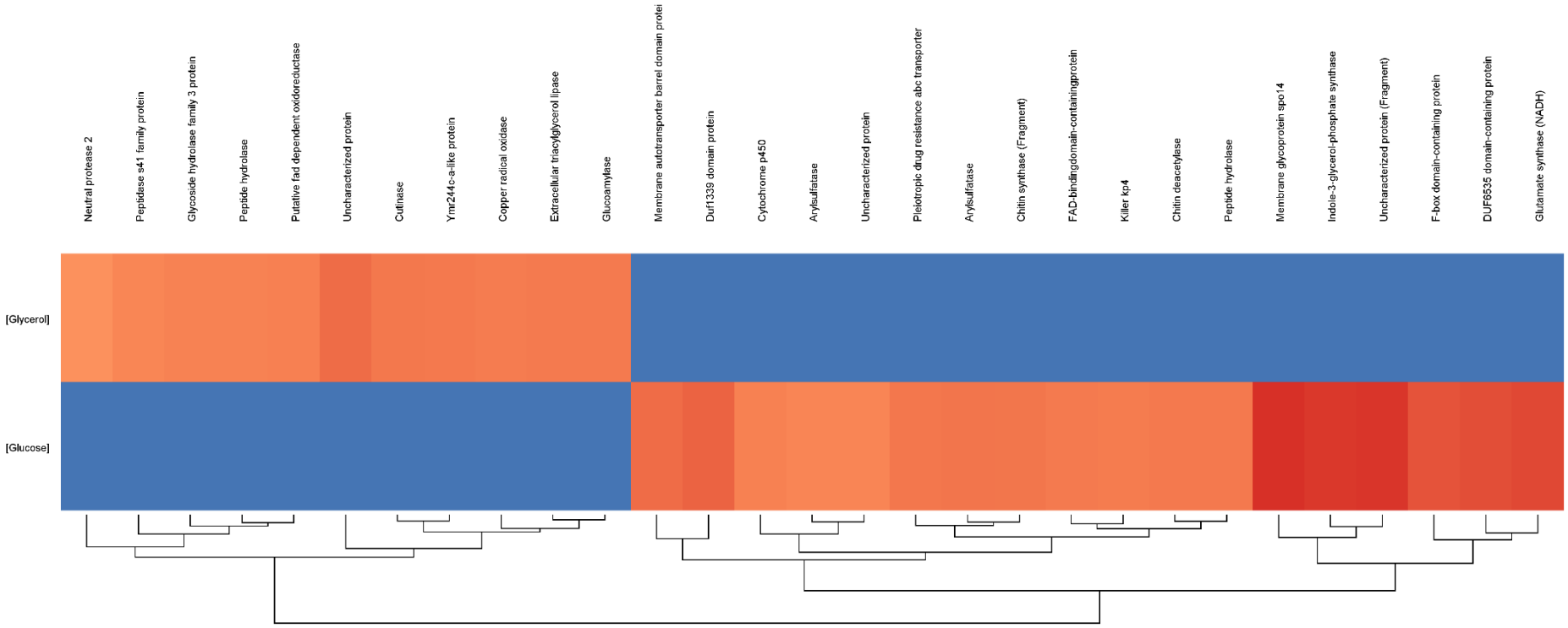

Figura 28 – *Heat Map*, representando o nível de abundância das proteínas diferenciais em cada tratamento considerando um *p-value*<0,05 e um *fold-change*≥1,5. Em vermelho, indicando abundância (*up*) e em azul, indicando ausência (*down*). A parte superior corresponde ao Secretoma com Glicerol, e a parte inferior, Secretoma com Glicose

5.0 - DISCUSSÃO

A validação biológica é um passo de suma importância para que se possa acompanhar visivelmente, os efeitos que um grupo complexo de proteínas ou isolados podem causar aos tecidos foliares da planta. Outros autores que trabalharam com secretoma, também utilizaram a estratégia da validação biológica com *Nicothiana benthamiana*, para resguardar os seus resultados (Yang et al., 2021; Liu et al., 2021; Shinya et al., 2021; Grosse-Holz et al., 2018; Evangelisti et al., 2017).

Para o crescimento do fungo *M. perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos como *Spathaspora passalidarum* (Ribeiro et al., 2021), *Aspergillus fumigatus* (Zhang et al., 2021), *Saccharomyces cerevisiae* (Flores; Gancedo, 2018) e *Ophiocordyceps communis* (Prathumpai; Kocharin, 2016) a glicose é a fonte de carbono preferencial para o crescimento e estabelecimento *in vitro*. Fontes alternativas, como glicerol (Xiberras et al., 2020), sacarose (Marques et al., 2016), frutose (De Gouvêa et al., 2018), maltose (Tatsch et al., 2021), galactose (Garcia-Albornoz et al., 2020) e entre outras, também podem ser utilizadas para o crescimento do fungo, porém, o crescimento e desenvolvimento *in vitro* geralmente é mais lento. A mudança na fonte de carbono, pode levar os organismos a apresentarem características relacionadas a resistência como uma maior secreção de proteínas relacionadas ao estresse, proteínas antioxidantes, modificação da parede celular, além da ativação de vias que reduzem a atividade basal, para a utilização eficiente de energia (Oliveira et al., 2021; Lopes et al., 2019; Wartenberg et al., 2011; Rosado et al., 2007).

Isso acontece porque a glicose é uma molécula facilmente catabolizada pelos fungos e outros organismos, devido ao seu fornecimento instantâneo de energia para realizar processos vitais no metabolismo basal (Dos Reis et al., 2016).

Estudos com diferentes fungos, avaliaram a repressão das enzimas especializadas na degradação de outros açúcares quando a glicose também é encontrada no meio (Qadri et al., 2021; Lagree et al., 2020; Adnan et al., 2018; Dos Reis et al., 2016; Ries et al., 2016; Kayikci; Nielsen, 2015; Ene et al., 2014). Esse processo também é capaz de reprimir a expressão de genes relacionados com a utilização de fontes alternativas de carbono (Lagree et al., 2020)

Diante disso, os fungos fitopatogênicos, desenvolvem um crescimento mais lento em fontes alternativas de carbono, quando comparado com fungos crescidos em glicose.

Na presença de fontes alternativas de carbono, além da ativação de genes e enzimas específicas, os fungos desenvolvem características que facilitam a sua sobrevivência e patogenicidade. Dentre essas podemos citar a alteração do proteoma celular (Garcia-Albornoz et al., 2020), onde ocorre o aumento da secreção de proteínas com ação de desintoxicação (Santos et al., 2008) que visam proteger o fungo de Espécies Reativas de Oxigênio, causando um aumento na produção de hidrolases, que atuam tanto na aceleração de reações e quebra de ligações covalentes, como hidrólise de polissacarídeos complexos, como a celulose (Basit et al., 2018).

Neste trabalho, foi possível observar que provavelmente há um maior gasto energético dos fungos quando encontrados em outras fontes de carbono diferente da glicose, pois, o crescimento micelial torna-se mais lento, tornando-se necessário um tempo superior a 15 dias para que os organismos se desenvolvam completamente e possam gerar uma massa micelial maior quando crescidos em glicerol. Por conta disso, conforme os resultados depois de 60 dias de crescimento, enquanto o micélio que crescia em glicose já entrava em uma fase estacionária, o micélio que crescia em glicerol adquiriu uma grande quantidade de massa micelial, tornando-se possível o processo de extração de proteínas de micélio e secretoma.

Como crescimento micelial de *M. perniciosa* crescido em glicerol durante 15 dias era menor do que a massa micelial do fungo crescido em glicose durante o mesmo período, a quantidade de proteínas secretadas (secretoma) encontradas no meio de cultura foram insuficientes para identificação de proteínas, e as outras análises realizadas neste trabalho**.** Isso se torna claro, quando observamos a comparação do perfil eletroforético do secretoma de 15 dias, com o de 60 dias (Figura 23).

No entanto, no tempo de 60 dias, foi possível identificar proteínas que estavam em maior quantidade (Figura 24). Essa diferença quantitativa de proteínas pode estar atrelada a alguns estudos que apontam, uma grande diferença na secreção de proteínas, síntese de polissacarídeos, processos relacionados a patogenicidade e processos transcricionais quando a fonte de carbono é alternativa a glicose (He et al., 2021; Lok et al., 2021; Gelain et al., 2020; Wu et al., 2020).

Entre várias fontes de carbono alternativas, a escolha do glicerol como fonte de carbono, se deu através de resultados observados em um trabalho prévio (Alvim, 2009) em que não envolvia espectrometria de massas, com uma tecnologia de alta sensibilidade como a do espectrômetro tipo quadrupolo/Tempo-de-Voo (*Agilent* 6545 LC/QTOF) e através de

informações obtidas em outros trabalhos (Klein, 2017;Mattenberger, 2017; Yaakoub et al., 2021) elucidando a importância do glicerol no processo de infecção através do *M. perniciosa*.

Scarpari et al. (2005) afirma que as vassouras verdes em *T. cacao* quando infectadas pelo fungo, contêm uma alta concentração de glicerol. Essa alta concentração, leva a níveis aumentados de peróxido de hidrogênio (H2O2) (Cascardo, J.C., comunicação pessoal; Santos et al., 2008), gerando estresse oxidativo em compostos que atuam na síntese do glicerol pelo fungo. Isso faz com que haja uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial e acúmulo anormal de espécies reativas de oxigênio (Zhang et al., 2021). Essa sequência de reações pode explicar a identificação de algumas proteínas antioxidantes e proteínas de resposta ao estresse encontradas no micélio de glicerol através de espectrometria de massas, que não foram abundantes, como por exemplo: *Heat shock protein hss1*, *Heat shock protein 90*, *Heat shock protein sks2* e *Heat shock protein* (sendo essa última destacada em vermelho na tabela 1).

No micélio de glicerol foi possível observar proteínas exclusivas ligadas a atividades relacionadas com a divisão celular, como por exemplo, a *Kinetochore protein SPC25* ligada ao movimento de microtúbulos, *Argonaute-like protein*, relacionadas a ligação de ácidos nucleicos, *Kinesin-like protein*, envolvida na atividade motora dos microtúbulos e *Tubulin alpha chain*, principal constituinte do citoesqueleto. No micélio de glicerol, também foi possível observar um menor número de proteínas histonas, quando comparadas ao micélio de glicose, o que também pode indicar uma maior atividade do DNA/RNA em glicerol. Santos et al., (2008) afirmam que o aumento da atividade de DNA/RNA, pode estar relacionada com as espécies reativas de oxigênio que em altas concentrações, gera uma sinalização que aumenta a transcrição de genes que possam levar a neutralização dos mesmos, através de proteínas que possam atuar direta, ou indiretamente nessa via.

Ainda no micélio de *M. perniciosa* crescido em glicerol, foi identificada uma proteína de ativação de “SnRNA”. Proteínas de SnRNA são pequenas moléculas encontradas no núcleo, que possuem atividade modificadora de RNA, influenciando diretamente na transcrição e facilitando o mecanismo de *splicing* alternativo (Yan; Wan; Shi, 2019), onde há a modificação a nível de RNA, o que também confere uma atividade a nível de transcritos.

Apesar da identificação de uma quantidade maior de proteínas exclusivas no micélio crescido em glicose (Figura 24), a maioria delas está relacionada a componentes celulares, proteínas que viabilizam os processos celulares e enzimas ligadas ao metabolismo de

carboidratos. Isso significa que quando a glicose é a única fonte de carbono no meio, processos moleculares que são ativados quando há mudança de fonte de carbono são interrompidos, levando ao uso exclusivo de enzimas ligadas ao metabolismo da glicose o que alguns autores chamam de Repressão do catabólito de carbono (CCR) (Qadri et al., 2021; Kayikci; Nielsen, 2015).

Proteínas de resposta a estresse como *Peroxidase*, *Glutathione peroxidase*, *Heme peroxidase*, *Heat shock protein*, *Heat shock protein hss1*, *Heat shock protein sks2*, *Heat shock protein 90* e *Small heat shock protein*, foram identificadas nos extratos proteicos miceliais de ambos os tratamentos, sendo mais abundante em glicerol. No micélio de glicose, isso pode ser justificado pelo próprio crescimento *in vitro*, que por si já é estressante e em longos períodos de crescimento, podem surgir a escassez de alguns compostos necessários para a manutenção do organismo.

Na análise de proteínas identificadas no secretoma de glicose, além de encontrar proteínas de resposta ao estresse como mencionado na tabela 2, também foram encontradas proteínas relacionadas com componentes celulares, como *Cytochrome p450* (destacada em vermelho na tabela 2), *Vacuolar membrane protein*, *Cytoplasmic protein*, o que pode indicar que houve extravasamento celular no meio e consequentemente a morte de alguns organismos.

Além de proteínas intracelulares, a proteína *Killer kp4* (destacada em vermelho na tabela 2), foi encontrada no secretoma de glicose. Cabe ressaltar que essa é uma proteína rica em cisteína, cuja ação está relacionada com a síntese de uma série de micotoxinas. Em contrapartida, essas proteínas estão diretamente relacionadas com o mecanismo de patogenicidade, inibindo crescimento celular e induzindo a morte das células do hospedeiro (Vicente et al., 2022; Lu; Faris, 2019; Motaung; Saitoh; Tsilo, 2018; Lu; Edwards, 2016; Gage et al., 2001). Isso pode explicar a presença de necrose nos tecidos foliares com o secretoma de glicose (Figura 19) já que as proteínas da família "*kp*" foram associadas a efetores que facilitam a busca de nutrientes em tecidos vivos e mortos (Zhang; Xu, 2014; Motaung; Saitoh; Tsilo, 2018).

No secretoma de glicerol, foi encontrada uma proteína que, apesar de não ser abundante, pode influenciar no processo de patogenicidade quando há a presença de glicerol nos tecidos (como é o caso das vassouras verdes de *T. cacao*) que é a "*PR-1-like protein*"; essa proteína já foi mencionada por outros autores como uma das principais moléculas envolvidas no processo de patogenicidade em outros fungos (Bakare; Gokul; Keyster, 2021; Gaikwad et

al., 2020; Lu; Edwards, 2018) e até em *M. perniciosa* (Vasconcelos et al., 2021; Baroni et al., 2017; Teixeira et al., 2012). Essa proteína era encontrada originalmente em plantas (Fernandes et al., 2009), como resposta ao estresse, porém durante a evolução de diversos fitopatógenos esses organismos conseguiram sintetizar uma proteína similar a proteína "*PR*" em plantas, possibilitando que houvesse sucesso sob o hospedeiro, como é o caso de *M. perniciosa*. A presença dessa proteína pode explicar a velocidade na necrose dos tecidos onde o secretoma de glicerol foi aplicado (Figura 19), por isso, chegamos à conclusão que na presença de glicerol, a doença torna-se mais severa.

Outras proteínas presentes no secretoma também podem influenciar no processo de desenvolvimento da doença e necrose dos tecidos, como as proteínas da família "*F-box*" por exemplo. Elas podem influenciar diretamente na interação proteína-proteína, catalisando algumas reações e influenciando diretamente na virulência fúngica (Wu et al., 2022; Abbad, 2012).

6.0 - CONCLUSÃO

Quando o glicerol é a única fonte de carbono disponível para o fungo *in vitro*, o uso do meio de cultura não é tão eficiente, como na glicose. Isso faz com que o crescimento e desenvolvimento do fungo *Moniliophthora perniciosa*, seja mais lento, comparado ao crescimento no meio com glicose. Através da identificação de proteínas é possível afirmar que existem diferenças na abundância das proteínas nos diferentes tratamentos, pois enquanto no micélio de glicose encontramos diversas proteínas intracelulares que atuam em diversas rotas metabólicas, no micélio de glicerol, encontramos diversas proteínas relacionadas ao processo de divisão celular e também uma proteína relacionada com a ativação de SnRNAs, que causam a modificação de transcritos.

Na validação biológica, houveram danos aos tecidos foliares em secretomas de ambos os tratamentos, porém, os maiores danos ao tecido foliar aconteceram nas folhas onde foram injetados o secretoma de glicerol. Isso pode explicar o surgimento de maiores áreas de necrose nas folhas tratadas com o secretoma de glicerol, além da identificação da proteína "*PR1- like*" que já é conhecida como uma proteína relacionada com a patogenicidade.

Trabalhos posteriores podem ser utilizados para validar a atividade proteica de proteínas, além da identificação de função das proteínas que ainda não são caracterizadas que foram encontradas nesse trabalho. Essas proteínas podem ser proteínas relacionadas a potencial

efetores estabelecendo novos conhecimentos importantes para estratégias de controle da doença que sejam mais eficazes e modernos.

7.0- REFERÊNCIAS

ABBAD, Samantha Vieira. Caracterização de um Novo Gene da Família F-box Expresso no Pistilo de *Nicotiana tabacum* L. 2012. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. Acesso em 19 de outubro de 2022.

ADNAN, Muhammad et al. Catabolic carbon repression in filamentous fungi. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 48, 2017. Acesso em 25 de outubro de 2022.

ALMAGRO Armenteros, José Juan et al. "SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks." **Nature biotechnology** vol. 37,4 (2019): 420-423. doi:10.1038/s41587-019-0036-z. Acesso em 20 de outubro de 2022.

ALMEIDA, Marcos Abreu et al. Análise proteômica comparativa de levedura e micélio de *Histoplasma capsulatum* revela mudanças metabólicas diferenciais e processos de remodelação da parede celular nos diferentes morfotipos. **Fronteiras em microbiologia**, p. 1424, 2021. Acesso em 14 de agosto de 2022.

AL-SAKEITI, MA et al. First report of sesame witches' broom (*Sesamum indicum*) in Oman. **Plant Disease**, v. 89, n. 5, pág. 530-530, 2005. Acesso em 14 de agosto de 2022.

ALVES, Akyla Maria Martins et al. The glutathione peroxidase family of *Theobroma cacao*: involvement in oxidative stress during witches' broom disease. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3698-3708, 2020. Acesso em 15 de julho de 2022.

ALVES-JÚNIOR, Miguel et al. Functional and morphological analysis of phylloplano and rizoplano endophytic bacteria isolates interacting in different cocoa production systems in the Amazon. **Current Research in Microbial Science**, v. 2, p. 100039, 2021. Acesso em 14 de agosto de 2022.

ALVES, Rafael Moysés et al. Seleção de genótipos de cupuaçu para ambiente de sistema agroflorestal na Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 56, 2021. Acesso em 14 de agosto de 2022.

ALVIM, F. C. et al. Carbon source-induced alterations in the physiology of the cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* (Basidiomycetes) affect mycelial morphology and the secretion of necrosis-inducing proteins. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 3, p. 1035-1050, 2009. Acesso em 9 de agosto de 2022.

AMARAL, Joana et al. Comparative proteomics of Pinus-*Fusarium circinatum* interactions reveal metabolic clues for resistance to biotic stress. **Physiologia plantarum**, v. 173, n. 4, p. 2142-2154, 2021. Acesso em 14 de agosto de 2022.

ANJO, Sandra Isabel; SANTA, Cátia; MANADAS, Bruno. SWATH-MS as a tool for biomarker discovery: From basic research to clinical applications. **Proteomics**, v. 17, n. 3-4, p. 1600278, 2017. Acesso em 25 de julho de 2022.

APROTOSOAIE, Ana Clara; LUCA, Simon Vlad; MIRON, Anca. Chemistry of cocoa flavor and cocoa products - an overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 73-91, 2016. Acesso em 15 de julho de 2022.

ARAÚJO, Danielle Silva et al. Employing proteomic analysis to compare yeast cell wall proteins *Paracoccidioides lutzii* and mycelium. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1865, n. 11, pág. 1304-1314, 2017. Acesso em 14 de agosto de 2022.

ARGOUT, X., Salse, J., Aury, J.M., Guiltinan, M.J., Droc, G., Gouzy, J., Allegre, M. et al. (2011) *Theobroma cacao* genome. **Nat. Genet**. **43**, 101– 108. Acesso em 1 de julho de 2022.

BAHIA DE AGUIAR, Paulo César; DE MOURA PIRES, Mônica. A região cacaueira do sul do estado da Bahia (Brasil): crise e transformação. **Cuadernos de Geografía: Revista Colombiana de Geografía**, v. 28, n. 1, p. 192-208, 2019. Acesso em 12 de julho de 2022.

BAKARE, Olalekan Olanrewaju; GOKUL, Arun; KEYSTER, Marshall. PR-1-like protein as a potential target for the identification of *Fusarium oxysporum*: An *in silico* approach. **Biotech**, v. 10, n. 2, pág. 8 de 2021. Acesso em 19 de outubro de 2022.

BAKER, Richard Eric Defoe et al. Cacao witches' broom (*Marasmius perniciosus* Stahel). **Phytopathological papers**, n. 2, 1957. Acesso em 13 de julho de 2022.

BARBOSA, Ceslaine Santos et al. Genome sequence and effectorama of subpopulations *Moniliophthora perniciosa* e *Moniliophthora roreri*. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2018. Acesso em 9 de agosto de 2022.

BARONI, Renata M. et al. Estrutura Cristalina de MpPR-1i, uma proteína SCP/TAPS de *Moniliophthora perniciosa*, o fungo que causa a doença da vassoura-de-bruxa do cacaueiro**. Relatórios científicos**, v. 7, n. 1, pág. 1-11, 2017. Acesso em 19 de outubro de 2022.

BARSOTTINI, Mário RO et al. Synthesis and testing of new alternative oxidase (AOX) inhibitors with antifungal activity against *Moniliophthora perniciosa* (Stahel), the causal agent of cocoa witches' broom and other plant pathogens. **Pest Management Science**, v. 75, n. 5, pág. 1295-1303, 2019. Acesso em 14 de agosto de 2022.

BASIT, Abdul et al. Xilanases termofílicas: da bancada à garrafa. **Revisões críticas em biotecnologia**, v. 38, n. 7, pág. 989-1002, 2018. Acesso em 18 de outubro de 2022.

BASTOS, C. N.; ANDEBRHAN, T. Urucu (*Bixa orellana*): nova espécie hospedeira da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacaueiro. **Fitopatología Brasileira (Brasil) v. 11 (4) p. 963-965**, 1986. Acesso em 14 de agosto de 2022.

BECKETT, Stephen T. A ciência do chocolate. **Sociedade Real de Química**, 2019. Acesso em 11 de julho 2022.

BISSON, Linda F.; FAN, Qingwen; WALKER, Gordon A. Transporte de açúcar e glicerol em *Saccharomyces cerevisiae*. **Transporte de membrana de levedura** p. 125-168, 2016. Acesso em 22 de dezembro de 2022.

BONAR, Emília; WÓJCIK, Iwona; WLADYKA, Benedykt. Proteomics in virulence studies of *Staphylococcus aureus*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, n. 3, 2015. Acesso em 14 de agosto de 2022.

BRAINER, Maria Simone de Castro Pereira. **Produção de cacau**. 2021. Acesso em 18 de outubro de 2022.

BRANCINI, Guilherme TP et al. The combination of transcriptomics and proteomics reveals potential post-transcriptional control of gene expression after light exposure in *Metarhizium acridum*. **G3: Genes, Genomas, Genetics**, v. 9, n. 9, pág. 2951-2961, 2019. Acesso em 14 de agosto de 2022.

BRANDÃO, Thaynara Lays Sales. Cacau como aliado da saúde cardiovascular: revisão de literatura. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 2, n. 3, p. 04-04, 2021. Acesso em. 20 de julho de 2022.

BRASIL. Decreto nº 40.987, de 20 de fevereiro de 1957. Institui o Plano de Recuperação Econômico Rural da Lavoura Cacaueira do País. **Casa Civil**: Subchefia para Assuntos Jurídicos, [S. l.], 20 fev. 1957. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1950-1969/D40987.htm. Acesso em 20 de julho de 2022.

CACCIA, Dario et al. Bioinformatics tools for secretome analysis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 11, pág. 2442-2453, 2013. Acesso em 14 de agosto de 2022.

CAI, Shengguan et al. Variation of protein content in grains and its association analysis in barley. **BMC Plant Biology**, v. 13, n. 1, pág. 1-11, 2013. Acesso em 15 de agosto de 2022.

CAI, Ying Li et al. Physiological characteristics and comparative analysis of the secretome of *Morchella importuna* grown on glucose, rice straw, sawdust, wheat grain and MIX substrates. **Frontiers in Microbiology**, p. 1065, 2021. Acesso em 14 de agosto de 2022.

CAOBISCO/ECA/FCC (2015**)** Grãos de cacau: requisitos de qualidade da indústria de chocolate e cacau: ECA-Caobisco-FCC Cocoa. Acesso em 12 de julho de 2022.

CAPORASO, J. Gregory et al. High-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME journal**, v. 6, n. 8, p. 1621-1624, 2012.Acesso em 12 de julho de 2022.

CARDOSO, Thyago Hermylly Santana et al. TcCYPR04, a cysteine protease similar to cocoa papain, detected in senescent and necrotic tissues, interacts with a cystatin TcCYS4. **PloS One**, v. 10, n. 12, pág. e0144440, 2015. Acesso em outubro de 2022.

CEPLAC – A vassoura-de-bruxa no estado do espirito santo. 2017. Disponível em: https://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/bitstream/item/48/1/Vassoura-de-bruxadoCacaueiro.pdf. Acesso em 16 de agosto de 2022.

CHEN, Sixue; HARMON, Alice C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, n. 20, p. 5504-5516, 2006. Acesso em 13 de agosto de 2022.

COLL, Nuria S.; EPPLE, Philipp; DANGL, Jeffery L. Programmed cell death in the plant's immune system. **Cell Death & Differentiation**, v. 18, n. 8, p. 1247-1256, 2011. Acesso em 14 de agosto de 2022.

CONRAD, Michaela et al. Sensoriamento e sinalização de nutrientes na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS microbiology reviews**, v. 38, n. 2, pág. 254-299, 2014. Acesso em 21 de dezembro de 2022.

COSTA, J. C. B. et al. Controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacaueiro. **Tecnologias Alternativas para o Controle de Pragas e Doenças. Viçosa-MG, Brazil: EPAMIG**, p. 25-47, 2006. Acesso em 12 de julho de 2022.

COSTA, Juliana L. et al. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa, interferes with cytokinin metabolism during infection of Micro-Tom tomatoes and promotes the development of symptoms. **New Phytologist**, v. 231, n. 1, pág. 365-381, 2021. Acesso em 1 de outubro de 2019.

CHITIVA-CHITIVA, Luis C. et al. Antifungal activity of chemical constituents of Piper weighingesanum C. DC. and derivatives against cocoa phytopathogenic fungi. **Moléculas**, v. 26, n. 11, pág. 3256, 2021. Acesso em 14 de agosto de 2022.

CRAY, Jonathan A. et al. Uma medida universal de caotropicidade e cosmotropicidade. **Microbiologia Ambiental** v. 15, n. 1, pág. 287-296, 2013. Acesso em 21 de Dezembro de 2022.

CRUZ, Jaqueline Fontes Moreau. **Caracterização das sementes de variedades de cacau *Theobroma cacao* L. resistentes à vassoura-de-bruxa durante a fermentação e após a secagem**. 2012. Acesso em 20 de julho de 2022.

DARWICHE, Rabih et al. Plant pathogenesis-related proteins of the cocoa fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa* differ in their lipid-binding specificities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 50, p. 20558-20569, 2017. Acesso em 9 de agosto de 2022.

DE ANDRADE SILVA, Edson Mario et al. Development of *Moniliophthora perniciosa*: key genes involved in stress-mediated cell wall organization and autophagy. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 1022-1035, 2020. Acesso em 1 de outubro de 2022.

DE GOUVÊA, Paula Fagundes et al. *Aspergillus fumigatus* transcriptome and secretome analysis in the presence of sugarcane bagasse. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, pág. 1-18, 2018. Aceso em 19 de outubro de 2022.

DE LIMA ALVES, Flávia et al. Estresses osmóticos e caotropicos concomitantes em *Aspergillus goesii*: solutos compatíveis determinam a janela biótica. **Genética atual**. v. 61, n. 3, pág. 457-477, 2015. Acesso em 21 de dezembro de 2022.

DE SOUZA RODRIGUES[1], Giselle; PIRES, José Luís; LUZ, Edna Dora Martins Newman. Índice de severidade da vassoura-de-bruxa para avaliar genótipos de cacaueiro inoculados artificialmente. Acesso em 12 de julho de 2022.

DIAS, Cristiano Villela et al. Formation of hydrogen peroxide in cocoa tissues infected by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 917-922, 2011. Acesso em 15 de julho de 2022.

DIAS, Nathália Cassia Ferreira. O papel do hormônio auxina na virulência do patógeno de cacau *Moniliophthora perniciosa*. 2022. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. Acesso em 11 de agosto de 2022.

Díaz-Valderrama JR, Leiva-Espinoza ST, Aime MC. The History of Cacao and Its Diseases in the Americas. **Phytopathology**. 2020 Oct;110(10):1604-1619. doi: 10.1094/PHYTO-05-20-0178-RVW. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32820671. Acesso em 14 de dezembro de 2022.

DÓRIA, Milena Santos; PIROVANI, Carlos Priminho. Proteomic Response of Host Plants to the sadness virus in Citrus. In: **Citrus Tristeza Virus**. Humana, New York, NY, 2019. p. 209-218. Acesso em 13 de agosto de 2022.

DOS REIS, Thaila Fernanda et al. Identification and characterization of putative xylose and cellobiose transporters in *Aspergillus nidulans*. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1-19, 2016. Acesso em 25 de outubro de 2022.

DOS REIS, Thaila Fernanda et al. Identification of glucose transporters in *Aspergillus nidulans*. **PLoS One** v. 8, n. 11, pág. e81412, 2013. Acesso em 21 de dezembro de 2022.

DOS SANTOS, Everton Cruz et al. The pathogen *Moniliophthora perniciosa* promotes differential proteomic modulation of cacao genotypes with contrasting resistance to witches´ broom disease. **BMC Plant Biology**, v. 20, n. 1, p. 1-21, 2020. Acesso em 14 de dezembro de 2022.

DRESSANO, Guilherme Faganello. Análise da capacidade de silenciamento gênico de *Moniliophthora perniciosa* como método de controle. 2019. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. Acesso em 12 de agosto de 2022.

ELLIS, Jeffrey G. et al. Recent progress in the discovery and functional analysis of effector proteins from fungal plant pathogens and oomycetes. **Current Opinion In Plant Biology**, v. 12, n. 4, p. 399-405, 2009. Acesso em 9 de agosto de 2022.

ELLIS, Terri N.; KUEHN, Meta J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. **Reviews of Microbiology and Molecular Biology**, v. 74, n. 1, pág. 81-94, 2010. Acesso em 20 de outubro de 2022.

EMBRAPA. Banco de imagens. **Embrapa Amazônia Ocidental**, 2015. Não paginado. Disponível em: https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/2004001/vassoura-de-bruxa. Acesso em 16 de agosto de 2022.

ENE, Iuliana V. et al. Metabolism in the pathogenesis of fungi. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 12, p. a019695, 2014. Acesso em 25 de outubro de 2022.

EVANGELISTI, Edouard et al. Time-resolved double transcriptomics reveal early induced *Nicotiana benthamiana* root genes and conserved infection-promoting *Phytophthora palmivora* effectors. **BMC Biology**, v. 15, n. 1, pág. 1-24, 2017. Acesso em 19 de outubro de 2022.

EVANS, Harry C. Cocoa diseases – the trilogy revisited. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1640-1643, 2007. Acesso em 11 de agosto de 2022.

EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of cacao witches' broom. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, n. 3, p. 515-523, 1980. Acesso em 13 de julho de 2022.

EVANS, H. C.; PRIOR, C. Cocoa bean diseases: causal agents and control. **Outlook on Agriculture**, v. 16, n. 1, p. 35-41, 1987. Acesso em 13 de julho de 2022.

FAOSTAT - Data production and trading. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#data/. Acesso em: 11 de julho de 2022.

FARWICK, Alexander e cols. Engenharia de transportadores de hexose de levedura para transportar D-xilose sem inibição por D-glicose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 14, pág. 5159-5164, 2014. Acesso em 21 de dezembro de 2022.

FERNANDES, C. de F. et al. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. **Embrapa Rondônia-Documentos** (INFOTECA-E), 2009. Acesso em 17 de outubro de 2022.

FERNANDES, Elaine Aparecida. Ciclos econômicos na produção, preço e exportação de cacau no Brasil. **Revista Produção Online**, v. 20, n. 2, p. 684-704, 2020. Acesso em 13 de julho de 2022.

FERNIE, Alisdair R.; STITT, Mark. On the disagreement of metabolomics with proteomics and transcriptomics: dealing with the increasing complexity in logic, chemistry and network interactions scientific correspondence. **Plant Physiology**, v. 158, n. 3, p. 1139-1145, 2012. Acesso em 13 de agosto de 2022.

FERRAZ, Pedro et al. *Moniliophthora Perniciosa*, the causative agent of witches' broom disease in cocoa is killed in vitro by yeasts *Saccharomyces Cerevisiae* e *Wickerhamomyces anomalus*. **Frontiers in Microbiology**, p. 2706, 2021. Acesso em 15 de julho de 2022.

FERREIRA, Adão de Siqueira et al. Crescimento micelial e síntese de proteínas de choque térmico em três isolados de fungos ectomicorrízicos sob condições de temperaturas supra-ótimas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 29-38, 2007. Acesso em 14 de agosto de 2022.

FLORES, Carmen-Lisset; GANCEDO, Carlos. Construction and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* strain capable of growing on glucosamine as the sole source of carbon and nitrogen. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, pág. 1-10, 2018. Acesso em 17 de outubro de 2022.

FIORIN, Gabriel Lorencini et al. Suppression of plant immunity by fungal chitinase-like effectors. **Current Biology**, v. 28, n. 18, p. 3023-3030. e5, 2018. Acesso em 9 de agosto de 2022.

FLOR, Harold H. Current status of the gene-by-gene concept. **Annual Phytopathology Review**, v. 9, n. 1, pág. 275-296, 1971. Acesso em 14 de agosto de 2022.

GAGE, MJ, BRUENN, J., FISCHER, M., SANDERS, D. e SMITH, TJ (2001). The fungal toxin KP4 inhibits growth in Ustilago maydis by blocking calcium absorption. **Molecular Microbiology**, 41: 775-785. Acesso em 19 de outubro de 2022.

GARCIA-ALBORNOZ, M. et al. Uma rede reguladora genética dependente de fonte de carbono integrada ao proteoma em *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Omics**, v. 16, n. 1, pág. 59-72, 2020. Acesso em 18 de outubro de 2022.

GASKELL, Jill et al. Transcriptome and secretome analyzes of the wood-decaying fungus *Wolfiporia cocos* support alternative mechanisms of lignocellulose conversion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, pág. 3979-3987, 2016. Acesso em 14 de agosto de 2022.

GELAIN, Lucas et al. Analysis of proteins secreted by *Trichoderma harzianum* P49P11 under limited carbon conditions. **Journal of proteômica**, v. 227, p. 103922, 2020. Acesso em 25 de outubro de 2022.

GHOSH, DK et al. Occurrence of Witches' broom, a new phytoplasmic disease of sour lime (*Citrus aurantifolia*) in India.**Plant Disease**, v. 83, n. 3, pág. 302-302, 1999. Acesso em 14 de agosto de 2022.

GOMES, Dayane Santos et al. Identification of a set of key proteins involved in the necrotrophic mycelium of *Moniliophthora perniciosa* and in the development of basidiocarps. **Fungal Genetics and Biology**, v. 157, p. 103635, 2021. Acesso em 15 de julho de 2022.

GOMES, Dayane Santos et al. Mycelial development that precedes basidiome formation in *Moniliophthora perniciosa* is associated with changes in chitin, sugar, and nutrient metabolism involving autophagy. **Fungal Genetics and Biology**, v. 86, p. 33-46, 2016. Acesso em 14 de agosto de 2022.

GRAMACHO, Karina Peres et al. Pathogenic variability of *Moniliophthora perniciosa* in three agroecological zones in the cocoa region of Bahia, Brazil.**Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, p. 7-13, 2016. Acesso em 12 de julho de 2022.

GROSSE-HOLZ, Friederike et al. The transcriptome, the extracellular proteome and the active secretome of the agroinfiltrate *Nicotiana benthamiana* reveal a wide and diverse repertoire of proteases. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 5, pág. 1068-1084, 2018. Acesso em 19 de outubro de 2022.

GRIFFIT, GW; HEDGER, JN The reproductive biology of biotypes of the cacao witches' broom pathogen, *Crinipellis perniciosa***. Heredity**, v. 72, n. 3, pág. 278-289, 1994. Acesso em 14 de agosto de 2022.

GYGI, Steven P. et al. Correlation between protein abundance and mRNA in yeast. **Molecular And Cellular Biology**, v. 19, n. 3, p. 1720-1730, 1999. Acesso em 13 de agosto de 2022.

HE, Huihui et al. The carbon source affects the synthesis, structures and activities of mycelial polysaccharides of the medicinal fungus *Inonotus obliquus*. **Journal Microbiology Biotechnology**, 31: 855- 866. 2021. Acesso em 25 de outubro de 2022.

HEGEDUS, Dwayne D.; RIMMER, S. Roger. *Sclerotinia sclerotiorum*: when “to be or not to be” a pathogen? **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 2, p. 177-184, 2005. Acesso em 14 de agosto de 2022.

HIRUKI, C. Paulowni. The witches' broom is important in East Asia. In: **International Symposium on the Health of Urban Trees 496**. 1997. pág. 63-68. Acesso em 14 de agosto de 2022.

HOWDEN, Andrew JM; HUITEMA, Edgar. Post-translational modifications triggered by effectors and their role in suppressing plant immunity. **Frontiers In Plant Science**, v. 3, p. 160, 2012. Acesso em 14 de agosto de 2022.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agro 2017**: Resultados definitivos da produção de cacau 2017. Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=0&tema=76248. Acesso em 11 de julho de 2022.

ICCO. 2017. Boletim Trimestral de Estatísticas do Cacau. **Issue** No. 3-Volume XLIV.ICCO. Disponível em: https://www.icco.org. Acesso em 15 de julho de 2022.

IMAM, Jahangir et al. Microbial interactions in plants: prospects and applications of proteomics. **Current Protein and Peptide Science**, v. 18, n. 9, p. 956-965, 2017.Acesso em 13 de agosto de 2022.

International Cocoa Organization (2017) Análise do mercado de cacau. **International Cocoa Organization**: Côte d'Ivoire. Acesso em 1 de julho de 2022.

JABLONOWSKI, Karl. Hidden Markov models for identification and homology analysis of protein domains. In: SH2 Domains. **Humana Press**, Nova York, NY, 2017. p. 47-58. Acesso em 20 de outubro de 2022.

JORRIN-NOVO, Jesus V. et al. Plant proteomics based on gel electrophoresis: Past, present and future. Happy 10th anniversary Journal of Proteomics! **Journal of proteomics**, v. 198, p. 1-10, 2019. Acesso em 25 de julho de 2022.

JUBY, Baby et al. Mitigation of drought in cocoa (*Theobroma cacao L.*) through the development of tolerant hybrids. **BMC Plant Biology**, v. 21, n. 1, p. 1-12, 2021. Acesso em 30 de junho de 2022.

KAMOUN, Sophien. Groovy Times: effectors of filamentous pathogens revealed. **Current Opinion In Plant Biology**, v. 10, n. 4, p. 358-365, 2007. Acesso em 14 de agosto de 2022.

KAYIKCI, Ömur; NIELSEN, Jens. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 6, p. fov068, 2015. Acesso em 25 de outubro de 2022.

KELLER, Nancy P.; HOHN, Thomas M. Gene clusters of metabolic pathways in filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 21, n. 1, p. 17-29, 1997. Acesso em 14 de agosto de 2022.

KHAN, Md Tahsin et al. Exploring the *Legionella pneumophila* proteome to identify new therapeutics: a hierarchical subtractive genomics and reverse vaccinology approach. **Microbiology Spectrum**, p. e00373-22, 2022. Acesso em 14 de agosto de 2022.

Klein M, Swinnen S, Thevelein JM, Nevoigt E. Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. **Environ Microbiol**. 2017 Mar;19(3):878-893. doi: 10.1111/1462-2920.13617. Epub 2017 Jan 30. PMID: 27878932. Acesso em 14 de dezembro de 2022.

KNOGGE, Wolfgang. Fungal Infection Of Plants. **The Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1711, 1996. Acesso em 14 de agosto de 2022.

KONAR, Nevzat et al. Improving the functionality of chocolate: a review on probiotic, prebiotic and/or symbiotic characteristics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 35-44, 2016. Acesso em 11 de julho de 2022.

LAGREE, Katherine et al. Roles of *Candida albicans* Mig1 and Mig2 in glucose repression, pathogenicity traits and SNF1 essentiality. **PLoS genetics**, v. 16, n. 1, p. e1008582, 2020. Acesso em 25 de outubro de 2022.

LANG, Julien; COLOMBET, Jean. Sustained mismatch between MAPK signaling and pathogen effectors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, pág. 7954, 2020. Acesso em 14 de agosto de 2022.

LAKER, H. et al. A review of research on chemical control of cocoa witches' broom. **Cocoa Growers' Bulletin**, n. 42, p. 12-24, 1989. Acesso em 13 de julho de 2022.

LAWRENCE, J. S. et al. Cocoa diseases. II- Fungal diseases that occur on leaves, branches and trunk. **Agrotrópica**, v. 3, n. 1, p. 1-14, 1991. Acesso em 13 de julho de 2022.

LEAL, Juliana Cardoso et al. Análise proteômica dos secretomas dos fungos *Trichoderma harzianum* e *Fusarium solani*. 2019. **Dissertação de Mestrado**. Acesso em 14 de agosto de 2022.

LI, Erfeng et al. Comparative proteomic analyzes of two races of Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans that differ in pathogenicity. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, pág. 1-21, 2015. Acesso dia 14 de agosto de 2022.

LISBOA, Daniela O. et al. *Moniliophthora perniciosa*, The cacao witches' broom mushroom: insights into its taxonomy, ecology, and host range in Brazil. **Fungal Biology**, v. 124, n. 12, pág. 983-1003, 2020. Acesso em 14 de agosto de 2022.

LIU, B. et al. Fungal pathogens of cereal crops: proteomic insights into fungal pathogenesis, host defense and resistance. **Journal of Plant Physiology**, v. 269, p. 153593, 2022. Acesso em 14 de agosto de 2022.

LIU, Lisen et al. The protein secreted by *Verticillium dahliae* Vd424Y is required for full virulence, targets the nucleus of plant cells and induces cell death. **Molecular Pathology Of Plants**, v. 22, n. 9, pág. 1109-1120, 2021. Acesso em 18 de outubro de 2022.

LOBÃO D. et al. Cacau cabruca – Sistema agrosilvicultural tropical. **Ciência, tecnologia e manejo do cacaueiro**, p. 290-323, 2007. Acesso em 11 de agosto de 2022.

LOGINOV, Dmitry; ŠEBELA, Marek. Proteomics of survival structures of fungal pathogens. **New Biotechnology**, v. 33, n. 5, pág. 655-665, 2016. Acesso em 14 de agosto de 2022.

LOK, Bronwyn et al. The assimilation of different carbon sources in *Candida albicans*: aptitude and pathogenicity. **Medical Mycology**, v. 59, n. 2, pág. 115-125, 2021. Acesso em 25 de outubro de 2022.

LOPES, Eraldo Ferreira et al. Caracterização genômica e da capacidade de degradar componentes de petróleo de uma linhagem de *Burkholderia gladioli* isolada do Lago de Coari (Coari-Amazonas). **Tese de Doutorado**. 2019. Acesso em 25 de outubro de 2022.

LU, Ping et al. Proteomic analysis revealed metabolic inhibition and elongation and deamination factor by p-coumaric acid in *Cronobacter sakazakii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. Acesso em 14 de agosto de 2022.

LU, Shunwen; EDWARDS, Michael C. Genome analysis of secreted small cysteine-rich proteins identifies candidate effector proteins potentially involved in *Fusarium graminearum*-wheat interactions. **Phytopathology**, v. 106, n. 2, pág. 166-176, 2016.Acesso em 19 de outubro de 2022.

LU, Shunwen; EDWARDS, Michael C. Molecular characterization and functional analysis of identified PR-1-like proteins from the wheat head blight fungus *Fusarium graminearum*. **Phytopathology**, v. 108, n. 4, pág. 510-520, 2018. Acesso em 19 de outubro de 2022.

LU, Shunwen; FARIS, Justin D. KP4-like proteins from *Fusarium graminearum* have root growth inhibitory activity against wheat and potentially contribute to fungal virulence in seedling rot. **Fungal Genetics And Biology**, v. 123, p. 1-13, 2019. Acesso em 19 de outubro de 2022.

MAGAGNA, Federico et al. Comprehensive chemical fingerprinting of high quality cocoa in the early stages of processing: Effectiveness of combined non-targeted and targeted approaches to grading and discrimination. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v. 65, n. 30, p. 6329-6341, 2017. Acesso em 11 de julho de 2022.

MANDARINO, Edmundo Paolilo; GOMES, Augusto Roberto Sena. Produtividade do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) cultivado em blocos monoclonais, no sul da Bahia, Brasil. **Boletim técnico CEPLAC**, n. 197, p. 5-30, 2009. Acesso em 12 de julho de 2022.

Manejo das Doenças do Cacaueiro. **Curso online de capacitação sobre a cultura do cacaueiro**. Disponível em: https://biblioteca.incaper.es.gov.br/. Acesso em 16 de agosto de 2022.

MATTENBERGER, Florian e cols. Estresse de glicerol em *Saccharomyces cerevisiae*: respostas celulares e adaptações evoluídas. **Microbiologia ambiental**, v. 19, n. 3, pág. 990-1007, 2017. Acesso em 21 de deembro de 2022.

MARQUES, Wesley Leoricy et al. Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: a sweeter relationship. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 1, 2016. Acesso em 18 de outubro de 2022.

MAPPA, Charlotte et al. Assessing the ratio of Bacillus spores to vegetative cells by shotgun proteomics. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 20, p. 25107-25115, 2021. Acesso em 14 de agosto de 2022.

MARDIS, Elaine R. State-of-the-art DNA sequencing methods. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 9, n. 1, p. 387-402, 2008. Acesso em 12 de julho de 2022.

MARELLI, Jean-Philippe et al. Chocolate under threat from old and new cocoa diseases. **Phytopathology**, v. 109, n. 8, p. 1331-1343, 2019. Acesso em 15 de julho de 2022.

MASCARENHAS, Gilberto Carlos Cerqueira. A atual conjuntura socioeconômica e ambiental da região Sul da Bahia e a agricultura sustentável como uma alternativa concreta. **O desafio da agricultura sustentável: alternativas viáveis para o Sul da Bahia**, p. 13-32, 2004. Acesso em 12 de julho de 2022.

MCARDLE, Andrew James; MENIKOU, Stephanie. What is proteomics? **Archives of Disease in Childhood-Education and Practice**, v. 106, n. 3, p. 178-181, 2021. Acesso em 8 de agosto de 2022.

MEDINA, Martha L.; KIERNAN, Urban A.; FRANCISCO, Wilson A. Proteomic analysis of rutin-induced secreted proteins from *Aspergillus flavus*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 3, p. 327-335, 2004. Acesso em 14 de agosto de 2022.

MEINHARDT, Lyndel W. et al. *Moniliophthora perniciosa*, the causative agent of cocoa witches' broom: what's new about this old enemy? **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 5, p. 577-588, 2008. Acesso em 15 de julho de 2022.

MOLANO, Eddy Patrícia Lopez et al. Genome analysis of *Ceratocystis cacaofunesta* reveals a large expansion of extracellular phosphatidylinositol-specific phospholipase-C genes (PI-PLC). **BMC Genomics**. v. 19, n. 1, pág. 1-24, 2018. Acesso em 14 de agosto de 2022.

MONDEGO, Jorge et al. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 1-25, 2008. Acesso em 11 de agosto de 2022.

MONDEGO, Jorge Maurício Costa et al. Genomics, transcriptomics and beyond: the fifteen years of the cocoa witches' broom genome project. In: **Cacao Diseases**. Springer, Cham, 2016. p. 179-210. Acesso em 15 de julho de 2022.

MONTAGNA, Maria Teresa et al. Chocolate, "food of the gods": history, science and human health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 24, p. 4960, 2019. Acesso em 30 de junho de 2022.

MOTAUNG, Thabiso E.; SAITOH, Hiromasa; TSILO, Toi J. Large-scale molecular genetic analysis in plant pathogenic fungi: a decade of genome-wide functional analysis. **Molecular Pathology Of Plants**, v. 18, n. 5, pág. 754-764, 2017.Acesso em 17 de outubro de 2022.

MONTI, Chiara et al. Proteomics becomes functional. **Journal of proteomics**, v. 198, p. 36-44, 2019. Acesso em 25 de julho de 2022.

MORETTI-ALMEIDA, G. et al. Heterologous expression of an alternative oxidase from *Moniliophthora perniciosa* in *Saccharomyces cerevisiae*: antioxidant function and in vivo platform for the study of new drugs against witches' broom disease. **Fungal Genetics and Biology**, v. 126, p. 50-55, 2019. Acesso em 9 de agosto de 2022

MOTAMAYOR, Juan Carlos et al. Domestication of Cacao I: The Origin of Cacao Cultivated by the Maya. **Heredity**, v. 89, n. 5, p. 380-386, 2002. Acesso em 30 de junho de 2022.

MOTAMAYOR, Juan C. et al. Geographic differentiation and population genetics of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). **PloS One**, v. 3, n. 10, p. e3311, 2008. Acesso em 15 de julho de 2022.

NARAYANASAMY, Punitha. Molecular Biology in Plant Pathogenesis and Disease Management. **Disease Management**. Springer Science & Business Media, 2008. Acesso em 13 de julho de 2022.

NASCIMENTO, H. S. S. O. Melhoria do aroma de chocolate, por tratamento enzimático, em amêndoas de cacau de baixa qualidade. 2010. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)**. Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana-BA, 2010. Acesso em 20 de julho de 2022.

NESVIZHSKII AI. A survey of computational methods and error rate estimation procedures for peptide and protein identification in shotgun proteomics. **J Proteomics** 2010; 73:2092–123. Acesso em 25 de julho de 2022.

O cacau que Transforma Vidas: Além de proteger a biodiversidade e dar mais qualidade ao chocolate, métodos agroflorestais e mais sustentáveis também impactam positivamente os produtores. [*S. l.*], 2019. Disponível em: https://yam.com.vc/alimentacao/800686/o-cacau-que-transforma-vidas. Acesso em: 15 de agosto de 2022.

OLIVEIRA, Lucas Nojosa et al. Análise proteômica baseada no iTRAQ de *Paracoccidioides brasiliensis* em resposta à hipóxia. **Pesquisa Microbiológica**, v. 247, p. 126730, 2021. Acesso em 25 de outubro de 2021.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ E. D. M. N. Identificação e manejo das principais doenças do cacaueiro no Brasil. Ilhéus, **CEPLAC/CEPEC/SEFIT**, p. 55-63, 2005, p.132. Acesso em 21 de julho de 2022.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. Principais doenças do cacaueiro e seu manejo. **Ciência, tecnologia e manejo do cacaueiro**, p. 187-275, 2012. Acesso em 13 de julho de 2022.

OLIVEIRA, Vandete Almeida Silva**.** O enigma da vassoura-de-bruxa: análise de um choque exógeno na economia de Ilhéus/BA. 2017. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal da Bahia (UFBA). Acesso em 12 de agosto de 2022.

OSORIO-GUARÍN, Jaime A. et al. Genome-wide association study reveals new candidate genes associated with productivity and disease resistance for *Moniliophthora* spp. in cocoa (*Theobroma cacao L.)*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 10, n. 5, p. 1713-1725, 2020. Acesso em 15 de julho de 2022.

PASCHOAL, Daniele et al. *Moniliophthora perniciosa* infection reprograms tomato Micro-Tom physiology, establishes a sink and increases secondary cell wall synthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 73, n. 11, pág. 3651-3670, 2022. Acesso em 14 de agosto de 2022.

PAPER, Janet M. et al. Comparative proteomics of extracellular proteins in vitro and in planta from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. **Proteomics**, v. 7, n. 17, pág. 3171-3183, 2007. Acesso em 14 de agosto de 2022.

PENG, Yan et al. Advances in research on phytopathogenic fungi and their role as biocontrol agents. **Frontiers in Microbiology**, p. 1209, 2021. Acesso em 19 de outubro de 2022.

PEREIRA, J. L.; DE ALMEIDA, L. C. C.; SANTOS, S. M. Cacao witches' broom in Bahia: attempts to eradicate and contain it. **Crop Protection**, v. 15, n. 8, p. 743-752, 1996. Acesso em 11 de agosto de 2022.

PEREIRA, J. L. Management of the Cocoa Witch's Broom: a contemporary retrospective. **Cocoa Producers' Alliance, Lagos, Nigeria**, 2000. Acesso em 13 de julho de 2022.

PÉREZ-VICENTE, Luis. *Moniliophthora roreri* HC Evans et al. y *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime: impacto, síntomas, diagnóstico, epidemiología e manejo. **Revista de Protección Vegetal**, v. 33, n. 1, p. 00-00, 2018. Acesso em 25 de julho de 2022.

PHALIP, Vicente et al. Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* cultivated in plant cell wall. **Current Genetics**, v. 48, n. 6, pág. 366-379, 2005. Acesso em 14 de agosto de 2022.

PIRKKALA, Lila; NYKÄNEN, Päivi; SISTONEN, LEA Papéis dos fatores de transcrição do choque térmico na regulação da resposta ao choque térmico e além. **A Revista FASEB**, v. 15, n. 7, pág. 1118-1131, 2001. Acesso em 21 de dezembro de 2021.

PIROVANI, Carlos Priminho et al. Cystatins from *Theobroma cacao* impair mycelial growth of *Moniliophthora perniciosa* and are involved in postponing symptoms of cell death. **Plant**, v. 232, n. 6, p. 1485-1497, 2010. Acesso em 14 de agosto de 2022.

POHLAN, H. A. J., and PÉREZ, V. D. (2010). "Cocoa Growth and Production", in Soils, Plant Growth and Croup Production – Volume III. **Ed. W. H. Verheye (Oxford, UK: EOLSS Publishers)**. Acesso em 15 de julho de 2022.

POLICARPO JÚNIOR. Terrorismo biológico. Veja, Edição 1961, ano 39, n. 24, p. 60-63. São Paulo: **Editora Abril**, 21 jun. 2006. Acesso em 13 de julho de 2022.

Portal do Conteúdo Agropecuário**. Vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*)**. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/problemas/vassoura-de-bruxa_3046.html. Acesso em 16 de agosto de 2022.

PRATHUMPAI, W.; KOCHARIN, K. Optimization of Phomalactone and production of entomopathogenic fungi by *Ophiocordyceps communis* BCC 1842 e BCC 2763. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, n. 1, pág. 44-48, 2016. Acesso em 18 de outubro de 2022.

PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of witches' broom in cocoa: Biology, Epidemiology and Management. **Annual review of phytopathology**, v. 34, n. 1, p. 573-594, 1996. Acesso em 13 de julho de 2022.

QADRI, Hafsa et al. Glucose-The X factor for survival of human fungal pathogens and disease progression in the host. **Microbiological Research**, v. 247, p. 126725, 2021. Acesso em 25 de outubro de 2022.

QUEIROGA, Vicente de Paula et al. Cacau (*Theobroma cacao*, l.) orgânico sombreado tecnologias de plantio e produção de amêndoa fina. Campina Grande: **Associação da Revista Eletrônica A Barriguda**, 2021. 387 p. Disponível em: https://issuu.com/abarriguda/docs/livro_cacau. Acesso em: 21 de julho de 2022.

QUELAL-VÁSCONEZ, Maribel Alexandra et al. Quality control script and cocoa authenticity in the industry: a review of conventional and alternative methods. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 19, n. 2, p. 448-478, 2020. Acesso em 11 de julho 2022.

REINA, Rocio et al. Chondrostereum purpureum genome and secretome correspond to saprotrophic and phytopathogenic lifestyles. **PloS One**, v. 14, n. 3, pág. e0212769, 2019. Acesso em 14 de agosto de 2022.

REIS, Graciele Santos Monteiro et al. Proteomic profiles of young and mature cocoa leaves subjected to mechanical stress caused by wind. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 155, p. 851-867, 2020. Acesso em 13 de agosto de 2022.

RIBEIRO, Lílian E. et al. Influence of glucose on xylose metabolism by *Spathaspora passalidarum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 157, p. 103624, 2021. Acesso em 18 de outubro de 2022.

RIBEIRO, Miguel AQ et al. Rootstock × scion interactions in *Theobroma cacao* resistance to witches' broom: photosynthetic, nutritional and antioxidant metabolism responses. **Acta physiologiae plantarum**, v. 38, n. 3, p. 1-14, 2016. Acesso em 13 de julho de 2022.

RICHARDSON, Tom G. et al. A protein domain and family based approach to association analysis of rare variants. **Plos One**, v. 11, n. 4, pág. e0153803, 2016. Acesso em 20 de outubro de 2022.

RIES, Laure NA et al. Diverse regulation of the CreA carbon catabolite repressor in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v. 203, n. 1, p. 335-352, 2016. Acesso em 25 de outubro de 2022.

RIVERA, Johanna et al. *Bacillus anthracis* produz vesículas derivadas de membrana contendo toxinas biologicamente ativas. **Anais da Academia Nacional de Ciências**, v. 107, n. 44, pág. 19002-19007, 2010. Acesso em 20 de outubro de 2022.

ROCHA, H. M.; WHEELER, B. E. J. Factors influencing the production of basidiocarps and the deposition and germination of basidiospores of *Crinipellis perniciosa*, the causal fungus of witches' broom in cacao (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology**, v. 34, n. 3, p. 319-328, 1985. Acesso em 13 de julho de 2022.

ROGERS, Simon et al. Investigating the correspondence between transcriptomic and proteomic expression profiles using coupled cluster models. **Bioinformatics**, v. 24, n. 24, p. 2894-2900, 2008. Acesso em 25 de julho de 2022.

ROSADO, Ivan V. et al. QID74 *Trichoderma harzianum* cell wall protein is involved in cell protection and adhesion to hydrophobic surfaces. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, n. 10, pág. 950-964, 2007.

ROUX, Fabrice et al. Resistance to phytopathogens and tutti quanti: putting the quantitative resistance of plants to diseases on the map. **Molecular Pathology Of Plants**, v. 15, n. 5, pág. 427, 2014. Acesso em 14 de agosto de 2022.

ROZANOVA, Svitlana et al. Proteomics based on quantitative mass spectrometry: an overview. **Quantitative Methods in Proteomics**, p. 85-116, 2021. Acesso em 8 de agosto de 2022.

RUSCONI, Manoel; CONTI, Ário. *Theobroma cacao* L., o Alimento dos Deuses: Uma abordagem científica além dos mitos e alegações. **Pesquisa farmacológica**, v. 61, n. 1, pág. 5-13, 2010. Acesso em 30 de junho de 2022.

SALEH, Sara et al. Targeted proteomics to study pathogenic bacteria. **Proteomics**, v. 19, n. 16, p. 1800435, 2019. Acesso em 14 de agosto de 2022.

SANTOS, Francisca FJ et al. Mycelial growth, starch degradation capacity and aggressiveness of *Moniliophthora perniciosa* isolates to cocoa. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 1, p. 21-27, 2017. Acesso em 13 de julho de 2022.

SANTOS, R. X. et al. Carbon source-dependent variation of acquired mutagenic resistance of *Moniliophthora perniciosa*: Similarities in natural and artificial systems. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 6, p. 851-860, 2008. Acesso em 9 de agosto de 2022.

SCARPARI, L. M. et al. Biochemical changes during witches' broom development: the most important cacao disease in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 413, p. 865-877, 2005. Acesso em 13 de julho de 2022.

SCHMIDT, R. A. et al. Comparative epidemiology of the witches' broom pathosystem. In: **Disease Management In Cocoa**. Springer, Dordrecht, 1993. p. 131-155. Acesso em 13 de julho de 2022.

SCOTTON, Danielle Camargo. Genômica funcional da interação cacaueiro **(***Theobroma cacao L***.)** x *Moniliophthora perniciosa* por meio do sistema modelo Micro-Tom **(***Solanum lycopersicum L***.)**. 2012. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. Acesso em 11 de agosto de 2022.

SENA K. Alemanno L; GRAMACHO K. P. 2014. The process of *Moniliophthora perniciosa* infection in cocoa. ***Plant Pathology* 63**: 1272 – 1281. Acesso em 1 de outubro de 2022.

SHINYA, Ryoji et al. Comparative secretome and functional analyzes reveal glycoside hydrolase family 30 and cysteine peptidase as determinants of virulence in the pine nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. **Frontiers in plant science**, v. 12, p. 268, 2021. Acesso em 18 de outubro de 2022.

SILVA, S. D. V. M. et al. Redescrição da sintomatologia causada por *Crinipellis perniciosa* em cacaueiro. **Agrotropica**, v. 1, p. 1-23, 2002. Acesso em 13 de julho de 2022.

SILVA, Stela Dalva Vieira Midlej et al. Seleção de progenitores de cacaueiro quanto à resistência à vassoura-de-bruxa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 680-685, 2010. Acesso em 13 de julho de 2022.

SIMKOVICH, Aaron; KOHALMI, Susanne E.; WANG, Mirando. Purification and Proteomic Analysis of Phloem Tissues from Virus-Infected Plants. In: **Plant Virology**. Humana, Nova York, NY, 2022. p. 125-137. Acesso em 1 de outubro de 2022.

SMITH LM, Kelleher NL. Proteoforms as the next proteomic coin. **Science**. 2018 Março 9;359(6380):1106-1107. Acesso em 8 de agosto de 2022.

SRIVASTAVA, Vaibhav; REZINCIUC, Svetlana; BULONE, Vicente. Quantitative proteomic analysis of four developmental stages of *Saprolegnia parasitica*. **Frontiers in microbiology** , v. 8, p. 2658, 2018. Acesso em 14 de agosto e 2022.

TATSCH, Évelin F. et al. Characterization of the influence of carbon sources on fum1 gene expression in the fumonisin producer *Fusarium verticillioides* using the RT-LAMP assay. **International Journal of Food Microbiology**, v. 354, p. 109323, 2021. Acesso em 17 de outubro de 2022.

TEIXEIRA, Paulo José Pereira Lima; THOMAZELLA, Daniela Paula de Toledo; PEREIRA, Gonçalo Amarante Guimarães. Chocolate time: current understanding and new perspectives in cocoa witches' broom research. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 10, pág. e1005130, 2015. Acesso em 13 de julho de 2022.

TEIXEIRA PJ; THOMAZELLA DP; VIDAL RO; DO PRADO PF; REIS O; BARONI RM, et al. (2012) The fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa* has genes similar to the PR-1 plant that are highly expressed during its interaction with cocoa. **PLoS ONE** 7(9): e45929. Acesso em 1 de outubro de 2022.

TEIXEIRA PJPL, THOMAZELLA DP and PEREIRA GAP, Time for chocolate: current understanding and new perspectives on cacao witches' Broom disease research. **PLoS Pathog** 11:1–8 (2015). Acesso em 14 de dezembro de 2022.

TEIXEIRA PJPL; THOMAZELLA DPDT; REIS O; DO PRADO PFV; DO RIO MCS; FIORIN GL; JOSÉ J; COSTA GGL; NEGRI VA; MONDEGO JMC *et al*. 2014. Perfil de transcrição de alta resolução da interação biotrófica atípica entre *Theobroma cacao* e o patógeno fúngico *Moniliophthora perniciosa*. **Célula Vegetal 26:** 4245 – 4269. Acesso em 1 de outubro de 2022.

TEMPLE, Mark D.; PERRONE, Gabriel G.; DAWES, Ian W. Respostas celulares complexas a espécies reativas de oxigênio. **Tendências em biologia celular,** v. 15, n. 6, pág. 319-326, 2005.Acesso em 21 de Dezembro de 2022.

TESEI, Donatella et al. Effects of simulated microgravity on the black fungus proteome and secretome polyextreme tolerant *Knufia chersonesos*. **Frontiers in genetics**, v. 12, p. 638708, 2021. Acesso em 14 de agosto de 2022.

TEUSINK, Bas et al. O perigo das vias metabólicas com design turbo. **Tendências em ciências bioquímicas**, v. 23, n. 5, pág. 162-169, 1998.Acesso em 21 de dezembro de 2022.

THOROLD, C. A. Investigations of witches' broom disease v. Large-scale experiments in direct control. **Tropical Agriculture**, v. 20, n. 9, 1943. Acesso em 13 de julho de 2022.

VACA, Jéssica et al. Indole alkaloid derivatives as building blocks of natural products of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus velezensis* and their study of antibacterial and antifungal activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 73, n. 11, pág. 798-802, 2020. Acesso em 14 de agosto de 2022.

VASCONCELOS, Adrielle A. et al. Adaptive evolution of Moniliophthora PR-1 proteins towards their pathogenic lifestyle. **BMC ecology and evolution**, v. 21, n. 1, p. 1-16, 2021. Acesso em 9 de agosto de 2022.

VICENTE, Isabel e cols. Insights sobre proteínas semelhantes à toxina KP4 de espécies de Fusarium em interações interespecíficas. **Revista dos Fungos**, v. 8, n. 9, pág. 968, 2022. Acesso em 19 de outubro de 2022.

WANG, Shengjie et al. Combined transcriptome and metabolome analysis of *Nerium indicum* L. elaborates on the main pathways that are activated in response to witches' broom disease. **BMC Plant Biology**, v. 22, n. 1, pág. 1-27, 2022. Acesso em 14 de agosto de 2022.

WANG, Xiaogang et al. Release of extracellular vesicles from *Staphylococcus aureus* and its application as a vaccine platform. **Nature's Communications**, v. 9, n. 1, pág. 1-13, 2018. Acesso em 20 de outubro de 2022.

WARTENBERG, Dirk et al. *Aspergillus fumigatus* secretome analysis reveals Asp-hemolysin as the main secreted protein. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 7, pág. 602-611, 2011. Acesso em 25 de outubro de 2022

WICKRAMASURIYA, Anushka M.; DUNWELL, Jim M. Cocoa biotechnology: current status and future prospects.**Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 1, p. 4-17, 2018. Acesso em 30 de junho.

WILLIAMS, Jim P.; HALLSWORTH, John E. Limites da vida em ambientes hostis: não há barreiras para o funcionamento da biosfera?.**Microbiologia Ambiental** , v. 11, n. 12, pág. 3292-3308, 2009.Acesso em 21 de dezembro de 2022.

WIN, Nang Kyu Kyu et al. 'Candidatus *Phytoplasma balanitae*' associated with Balanites triflora witches' broom. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. Pt_2, pág. 636-640, 2013. Acesso em 14 de agosto de 2022.

WINTER, Daniel L.; WILKINS, Marc R.; DONALD, William A. Differential ion mobility mass spectrometry for detailed analysis of the proteome. **Trends in biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 198-213, 2019. Acesso em 25 de julho de 2022.

WOOD, George Alan Roskruge; LASS, R. A. Cacau. **John Wiley & Sons**, 1985. Acesso em 30 de junho de 2022.

WU, Carl. Factores de transcrição do choque térmico: estrutura e regulação. **Revisão anual de biologia celular e do desenvolvimento**, v. 11, n. 1, pág. 441-469, 1995. Acesso em 21 de dezembro de 2022.

WU, Ting et al. Role of the F-box protein Cdc4 in fungal virulence and sexual reproduction of *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, p. 1388, 2022. Acesso em 17 de outubro de 2022.

WU, Vincent W. et al. The regulatory and transcriptional landscape associated with carbon utilization in a filamentous fungus. **Annals of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 11, pág. 6003-6013, 2020. Acesso em 25 de outubro de 2022.

YAAKOUB, Hajar et al. A via do glicerol de alta osmolaridade (HOG) em fungos. **Critical Reviews in Microbiology**, p. 1-39, 2021. Acesso em 21 de dezembro de 2022.

YAN, Chuangye; WAN, Ruixue; SHI, Yigong. Molecular mechanisms of pre-mRNA splicing through spliceosome structural biology. **Cold Spring Harbor Perspectives On Biology**, v. 11, n. 1, pág. a032409, 2019. Acesso em 17 de outubro de 2022.

YANG, Bo et al. Fg12 ribonuclease secretion contributes to *Fusarium graminearum* virulence and induces plant cell death. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 63, n. 2, pág. 365-377, 2021. Acesso em 19 de outubro de 2022.

YANG, Mingzhang et al. NCBI conserved domain database and tools for protein domain analysis. **Current Protocols In Bioinformatics**, v. 69, n. 1, p. e90, 2020. Acesso em 9 de agosto de 2022.

XIBERRAS, Joeline et al. Active anaplerotic reactions during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glycerol. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 1, pág. foz086, 2020. Acesso em 17 de outubro de 2022.

ZADOKS, J. C. Phytopathological aspects of disease resistance and resistance breeding in cocoa: an external review. In: **Proceedings of the international workshop on the contribution of disease resistance to cocoa variety improvement,** Salvador, Brazil, 24-26 November 1996.-[Sl]: INGENIC, 199. 1999. p. 17-22. Acesso em 13 de julho de 2022.

ZHANG, Chi et al. GlcA-mediated glycerol-3-phosphate synthesis contributes to the oxidation resistance of *Aspergillus fumigatus* by decreasing cellular ROS. **Fungal Genetics and Biology**, v. 149, p. 103531, 2021. Acesso em 18 de outubro de 2022.

ZHANG, Shijie; XU, Jin-Rong. Effectors and effector delivery in *Magnaporthe oryzae*. **Pathogens PLoS**, v. 10, n. 1, pág. e1003826, 2014. Acesso em 17 de outubro de 2022.

ZHANG, Yufan; MAXIMOVA, Siela N.; GUILTINAN, Mark J. Characterization of a chocolate tree stearoyl-acyl transporter protein desaturase gene family, *Theobroma cacao* L. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 239, 2015. Acesso em 1 de julho de 2022.

ZHANG, Zhantao et al. Combined transcriptomic and proteomic analysis of developmental features in the immune system of *Plutella xylostella* during metamorphosis from larva to adult. **Genomics**, v. 114, n. 4, p. 110381, 2022. Acesso em 14 de agosto de 2022.

ZHAO, Shixue et al. Label-free proteomics and systematic secretome analysis reveal candidate effectors regulated by SGE1 and FTF1 in the plant pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, pág. 1-12, 2020. Acesso em 14 de agosto de 2022.

ZIEGLEDER, Gottfried. Linalool content as characteristic of some flavor grade cocoas. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 191, n. 4, p. 306-309, 1990. Acesso em 15 de julho de 2022.

ZIMMERMANN, Benno F.; ELLINGER, Sabine. Cocoa, chocolate and human health. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 698, 2020. Acesso em 30 de junho de 2022.

ZION MARKET RESEARCH. 2018. Mercado de chocolate por tipo de chocolate (preto, ao leite e branco) e por categoria de vendas (chocolate diário, chocolate premium e chocolate sazonal): Perspectiva da indústria global, análise abrangente e previsão de 2017–2024. 109, No. 8, 2019 1343. Disponível em: https://www.zionmarketresearch.com/report/chocolate-marketVol. Acesso em 15 de julho de 2022.

ZOU, Yajie et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals proteomic changes in *Pleurotus ostreatus* mycelium in response to heat stress and subsequent recovery. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2368, 2018. Acesso em 15 de agosto de 2022.