

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**



**RESPOSTAS CELULARES DO FUNGO *Moniliophthora perniciosa* AO ESTRESSE,
DURANTE SEU DESENVOLVIMENTO EM CULTIVO ARTIFICIAL**

EDSON MARIO DE ANDRADE SILVA

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Julho de 2018

EDSON MARIO DE ANDRADE SILVA

**RESPOSTAS CELULARES DO FUNGO *Moniliophthora perniciosa* AO ESTRESSE,
DURANTE SEU DESENVOLVIMENTO EM CULTIVO ARTIFICIAL**

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:
Biotecnologia e Genômica.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Julho de 2018

EDSON MARIO DE ANDRADE SILVA

**RESPOSTAS CELULARES DO FUNGO *Moniliophthora perniciosa* AO ESTRESSE,
DURANTE SEU DESENVOLVIMENTO EM CULTIVO ARTIFICIAL**

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:
Biotecnologia e Genômica.

EPÍGRAFE

Treine enquanto eles dormem, estude enquanto eles se divertem, persista enquanto eles descansam, e então, viva o que eles sonham.

(Provérbio Japonês)

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	O fungo <i>Moniliophthora perniciosa</i>	11
2.1.1	<i>Moniliophthora perniciosa</i> e a vassoura-de-bruxa	11
2.1.2	O ciclo de vida do fungo	14
2.1.3	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>M. perniciosa</i>	15
2.1.4	Os biotipos de <i>M. perniciosa</i> e seus hospedeiros	17
2.1.5	Era genômica e pós-genômica do fungo <i>M. perniciosa</i>	18
2.2	Desenvolvimento fungico e resposta a estresse	18
2.2.1	Sinalização celular	18
2.2.2	Via GTPase	19
2.2.3	Via de sinalização TOR	20
2.2.4	Parede celular de fungos: síntese e manutenção da integridade	21
2.2.5	Autofagia	22
2.3	Estudos de biologia de sistemas	23
2.3.1	Redes	25
2.3.2	Tipos de rede	29
2.3.3	Métodos para identificação e predição de interação proteína-proteína (IPP)	32
3	CAPÍTULO I	34
	Desenvolvimento de <i>Moniliophthora perniciosa</i>: genes chaves envolvidos na organização da parede celular e autofagia mediada por estresse	34
4	CAPÍTULO II	104
	MpNet: mapa de interólogos para seleção de proteínas alvo para o controle da vassoura-de- bruxa	104
5	CONCLUSÃO	148
6	REFERÊNCIAS	149

EXTRATO

SILVA, Edson Mario de Andrade, MS; Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, julho de 2018. **Respostas celulares do fungo *Moniliophthora perniciosa* ao estresse, durante seu desenvolvimento em cultivo artificial de bolachas.** Orientadora: DSc. Fabienne Micheli. Coorientadora: PhD. Karina Peres Gramacho and DSc. Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

A vassoura-de-bruxa é uma doença do cacaueiro causada pelo fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*. Essa doença trouxe graves prejuízos à cacauicultura no Brasil. Durante o seu desenvolvimento, *M. perniciosa* sofre intensas modificações na estrutura de sua parede celular, bem como no remodelamento de hifas, através de processos autofágicos que ocorrem devido a uma série de estímulos, como o estresse. Nesse sentido, genes relacionados à síntese e degradação de quitinas (sintase de quitina [Chs] quitinases [Cht]) e genes da autofagia (Atgs) são muito importantes nas mudanças da estrutura micelial e na resposta ao estresse. Realizamos a mineração de dados através da literatura e utilizamos Mapa de Interôlogo para selecionar genes-alvo que realizam interações físicas ou funcionais com Atg8, Chs3, Chit1 e Chit2. A rede obtida foi submetida à análise de módulo com o pacote *fastgreedy.community* em R. Os módulos identificados foram utilizados para analisar processos biológicos com o plugin Biological Networks Gene Ontology (BINGO) no Cytoscape. Os candidatos selecionados foram validados por expressão genica em diferentes fases do desenvolvimento de *M. perniciosa* (branco, amarelo, rosa, rosa escuro [pós-estresse] and primórdio). Os valores de $2^{-(\Delta C_t)}$ obtidos para cada gene foram utilizados para agrupamento hierárquico com *heatmap* e correlação de Pearson para identificar padrões de correlação entre a expressão relativa dos genes estudados. Onze genes, todos com domínios consistentes com os dos genes do principal modelo (*Saccharomyces cerevisiae*), foram utilizados para a análise interatômica. Genes relacionados com a síntese de glucanos (FKS1), dobramento de proteínas do ciclo celular (SSZ1), transmissão de sinais e autofagia (CDC42, RHO1, ROM2, TOR1, KOG1, AVO1 e ATG8), transmissão de sinal mediada por G (GDI1) e organização da parede celular (CHS1) foram selecionados. Genes relacionados à síntese de glucano e quitina, assim como os principais sinais para esses processos (RHO1, ROM2) apresentaram alta correlação positiva. *MpChit2* e *MpAtg8* apresentaram correlação positiva entre si e com genes relacionados aos processos de escassez de nutriente (complexo TORC1). Também, apresentamos aqui um dos primeiros relatos de uma abordagem mais aprofundada que integra a expressão gênica com redes de interação proteína-proteína, a fim de explorar os mecanismos celulares que ocorrem durante o desenvolvimento da cultura *in vitro* de *M. perniciosa*.

Palavras-chave: Pleiomorfismo; Biologia de sistema; GTPase; autofagia

ABSTRACT

SILVA, Edson Mario de Andrade, MS; Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, julho de 2018. **Cellular responses to stress of the fungus *Moniliophthora perniciosa* during its development in bran-based solid medium.** Advisor DSc. Fabienne Micheli. Advisor Committee Members: PhD. Karina Peres Gramacho and DSc. Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

The witches' broom disease of cocoa tree is caused by the fungus *Moniliophthora perniciosa*. This fungus is a hemibiotrophic basidiomycete that brought severe losses to cacao farming in Brazil. During its development, *M. perniciosa* undergoes intense modifications in the structure of its cell wall, as well as in the remodeling of hyphae through autophagic processes, due to a series of stimuli, such as stress. In this sense, genes related to the synthesis and degradation of chitin (chitin synthase [Chs] chitinases [Cht]) and autophagy genes (Atgs) are very important during mycelial structure modifications and stress response. We performed data mining through literature and used interatomic networks to select target genes that perform physical or functional interactions with Atg8, Chs3, Chit1 and Chit2. The obtained network was submitted to module analysis with the fastgreedy.community R package. The identified modules were used to analyze the biological processes using Biological Networks Gene Ontology (BINGO) plugin in Cytoscape. Candidates were selected and validated by gene expression in different phases of *M. perniciosa* development (white, yellow, pink, dark pink [post-stress] and primordium). The values of $2^{-(\Delta Ct)}$ obtained for each gene were used for heatmap hierarchical clustering and Pearson correlation analysis to identify correlation patterns between the relative expression of the studied genes. Eleven genes, all with domains consistent with those of the model genes (*Saccharomyces cerevisiae*) used for the interatomic analysis. Genes related with glucan synthesis (FKS1), folding of cell cycle proteins (SSZ1), signal transmission and autophagy (CDC42, RHO1, ROM2, TOR1, KOG1, AVO1 and ATG8), G-mediated signal transmission (GDI1) and cell wall organization (CHS1) were selected. Genes related to glucan and chitin synthesis, as well as the main signals for these processes (RHO1, ROM2) showed a high positive correlation. *MpChit2* and *MpAtg8* presented positive correlation between them, and with genes related to nutrient depletion processes (TORC1 complex). Also, we presented here one of the first reports of a more in depth approach that integrates gene expression with protein-protein interaction networks, in order to explore cellular mechanisms that occur during the development of *M. perniciosa* cultivated *in vitro*.

Palavras-chave: Pleiomorphism; Systems Biology; GTPase; autophagy

1 INTRODUÇÃO

Moniliophthora perniciosa (Stahel) Aime & Phillips-Mora [= *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer] (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005) é um importante patógeno, responsável por causar a vassoura-de-bruxa do cacau (Theobroma cacao L.). Essa doença trouxe grandes prejuízos para a cacauicultura, principalmente no sul da Bahia, que ainda tem o cacau como uma das principais culturas que movimentam a economia na região. A queda da produção de cacau na região chegou a ser de 59-90 %, tirando o Brasil da posição de segundo produtor mundial de cacau, para importador de 141 000 toneladas do produto, entre 1998 a 2000 (MEINHARDT et al., 2008).

Estudos em larga escala, como proteômica e transcriptômica, vêm sendo empregados para analisar o acúmulo de proteínas e transcritos, respectivamente, no decorrer da interação cacau-M. perniciosa, bem como no desenvolvimento do fungo cultivado *in vitro* (PIRES et al., 2009; SILVA et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2014; VILLELA-DIAS et al., 2014). Dados em larga escala têm sido empregados em análises computacionais no sentido de identificar e caracterizar as funções de proteínas e até mesmo descrever seus níveis de expressão. Porém, informações sobre o estado nativo de uma proteína e sua sequência de aminoácidos não explicam o grau de complexidade existente em um sistema biológico (FLÓREZ et al., 2010).

Estudos que levam em conta não apenas o estado nativo das proteínas e suas funções, mas um grau maior de complexidade dentro de um sistema, podem revelar proteínas centrais potencialmente utilizáveis como alvos de controle de doenças ou controle do desenvolvimento de patógenos, dentre outras aplicações. A identificação desses alvos pode ser feita com a integração de dados “Ômicos” (genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica). Para isso, ferramentas como a biologia de sistemas (chamada também de interatômica) têm sido amplamente empregada. A biologia de sistemas é uma abordagem interdisciplinar que se baseia em estudos das complexas interações do sistema biológico, focando nas interações entre suas moléculas (SAUER U.; ZAMBONI, 2007; YAMAUCHI et al., 1997). *Moniliophthora perniciosa* dispõe de informações Ômicas que nos permitem elevar os estudos voltados para esse patógeno para um nível de interação entre essas suas moléculas.

A principal ferramenta empregada pela biologia de sistemas, é a análise de redes, das quais podemos destacar aquelas que envolvem interação proteína-proteína (IPP) (FLÓREZ et

al., 2010). Essas redes possuem propriedades, como a propriedade livre de escala e essa de potência, que lhes colocam sob o controle de robustos fenômenos auto-organizadores que vão além das particularidades das peças individuais; além disso elas possuem nós centrais para o controle do sistema (BARABÁSI; ALBERT, 1999).

Atualmente muitos métodos experimentais são empregados para identificar redes IPP, como, por exemplo, o método de duplo híbrido (*yeast two-hybrid system-Y2H*), cromatografia de afinidade e imunoprecipitação (GAVIN et al., 2002; HARRINGTON; JENSEN; BORK, 2008; HO et al., 2002; ITO et al., 2001; PHIZICKY; FIELDS, 1995; QI; NOBLE, 2011). Em contrapartida, esses métodos possuem limitações, a exemplo, eles não são capazes de identificar as interações para todas as proteínas de um organismo e podem identificar interações que nunca acontecem em um sistema vivo, devido ao fato de que as moléculas envolvidas estão localizadas em compartimentos diferentes. Desse modo, métodos computacionais, podem ser utilizados com o intuito de identificar IPP usando as sequências dos aminoácidos de todas as proteínas de uma determinada espécie (SKRABANEK et al., 2008), possibilitando a descoberta de interações que os métodos experimentais não conseguem detectar.

Dentre as abordagens computacionais empregadas no estudo das IPP temos aquelas que empregam o perfil filogenético (HUYNEN; BORK, 1998; MARCOTTE et al., 2014), genoma *Neighborhood* (HARRINGTON; JENSEN; BORK, 2008), genes fundidos (ENRIGHT et al., 1999; MARCOTTE et al., 2014), co-evolução de sequências (SATO et al., 2005), dentre outros. Métodos como esses têm sido aplicados com sucesso na identificação de alvos para o controle de fitopatógenos, como no fungo da brusone do arroz, *Magnaporthe grisea* (HE et al., 2008), bem como na planta, no sentido de selecionar genes candidatos para a resitência a estresse biótico e abiótico (LIU et al., 2017). Em *Mycobacterium tuberculosis* e *Leishmania major* as abordagens computacionais de redes IPP também foram aplicadas no sentido de identificar alvos para o controle de doenças causadas por esses patógenos, em humanos (CASCANTE et al., 2002; CUI et al., 2009; FLÓREZ et al., 2010; REZENDE et al., 2012). Ainda, muitos trabalhos voltados para a compreensão da biologia de organismos como *Arabidopsis thaliana* e *Homo sapiens* empregam essa abordagem demonstrando que interatômas preditos são alternativas eficazes em estudos de Biologia de Sistemas (GARZÓN et al., 2016; LIN et al., 2011; WANG et al., 2014; ZHANG et al., 2016).

Além dos métodos citados acima, as comparações entre proteínas de um determinado organismo com os interatômas de organismos modelos presentes em bancos públicos são

utilizadas para transferir informações de IPP de uma espécie para outra. O interatôma obtido é chamado de mapa de interólogos. Esse mapa leva em consideração que se duas proteínas que interagem em um organismo tem alta similaridade contra outras duas proteínas em um segundo organismo, certamente essas últimas também interagirão (KIM et al., 2008; YU et al., 2004). Esse método é amplamente empregado em estudos de biologia de sistemas que usam ferramentas robustas como o banco de dados STRING e/ou que se baseiam em *Clusters of Orthologous Groups* (COGs) para transferir informações de um IPP para o outro (VON MERING et al., 2005).

Estudos de expressão gênica em *M. pernicioso* apontam genes relacionados a autofagia (ATG8), biossíntese e reciclagem da parede celular do fungo (*MpChit1*, *MpChit2*, *MpChs*) que são importantes no decorrer do seu desenvolvimento sob condições de escassez de nutrientes (GOMES et al., 2016). Nesse sentido, dados não publicados obtidos por nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biotecnológica e Genética da UESC) envolvendo os genes supracitados mostraram-se interessantes para desenvolver abordagens de interatômica. Genes como os que codificam o complexo TOR (*Target of Rapamycin*), genes de controle de processos de desenvolvimento filamentosos e o complexo glucano sintase têm se mostrado bons candidatos na análise do desenvolvimento do fungo. O complexo glucano sintase, é um dos que mais se destaca. Em *Saccharomyces cerevisiae* ele é formado por uma subunidade reguladora (RHO1) e uma subunidade catalítica (FKS1 e FKS2) que utiliza UDP-glicose como matéria prima para a biossíntese de glucano, que junto com a quitina, formam a parede celular do fungo. Esse complexo tem sido empregado com alvo de inibição do desenvolvimento de fungos tanto *in vitro*, como *in vivo* (BOWMAN; FREE, 2006; KITAMURA et al., 2009; KURTZ; REX, 2001; LIU; BALASUBRAMANIAN, 2001; ONISHI et al., 2000). Com base nos trabalhos de GOMES et al. (2016), essa dissertação apresenta como resultados: i) Criação de um interatôma para o fungo *Moniliophthora pernicioso* utilizando interólogos; ii) Seleção de possíveis alvos para inibidores do desenvolvimento do *M. pernicioso*; iii) Análise, por RT-qPCR, da expressão gênica de genes centrais na rede de interólogos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O fungo *Moniliophthora perniciosa*

2.1.1 *Moniliophthora perniciosa* e a vassoura-de-bruxa

Uma das culturas vegetais mais importantes para os países tropicais é a cacauicultura, que fornece matéria prima para a produção de chocolate, manteiga de cacau e cacau em pó. Só o mercado mundial de amêndoas de cacau torradas, no ano de 2012 produziu 9 bilhões de dólares e estima-se que o mercado global do produto processado, o chocolate, gire em torno de 80 bilhões de dólares ao ano (BRYAN A. BAILEY LYNDEL W. MEINHARDT, 2016). Apesar do montante gerado pelo mercado do cacau, a cacauicultura sofre prejuízos anuais muito elevados, devido a doenças causadas por fitopatógenos, como *Moniliophthora* (= *Crinipellis*) *perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005). Esse fitopatógeno é o fungo causador da doença vassoura-de-bruxa, no cacaueiro (*Theobroma cacao* L.). Ele foi inicialmente descrito como *Marasmius pernicius* Stahel, transferido para o gênero *Crinipellis* (*C. perniciosa* (Stahel) Singer) em 1942, mas só em 2005 foi definido como *Moniliophthora perniciosa* por Aime and Phillips-Mora (2005). *Moniliophthora perniciosa* é um basidiomiceto hemibiotrófico que coloniza diversos tecidos do seu hospedeiro, incluindo o fruto, gerando grandes perdas na produção (MEINHARDT et al., 2008). Esse fungo é o segundo maior responsável por perdas na cacauicultura de países das américas central e do sul, chegando a causar perdas anuais de 250 toneladas nessas regiões. A Figura 1 mostra a distribuição geográfica atual de diversos fitopatógenos do cacau, incluindo de *M. perniciosa*.

Os sintomas da vassoura-de-bruxa foram primeiramente descritos por volta de 1785 a 1787, na bacia Amazônica, por Alexandre Rodrigues Ferreira, o qual deu o nome de “lagartão” à doença devido ao inchaço causado pelo fungo (PURDY; SCHMIDT, 1996). Em seguida a doença se espalhou aos arredores da bacia Amazônica e regiões da América central (Suriname-1895; Guyana-1906; Equador-1918; Trinidad-1928; Colômbia-1929 e Grenada-1948) (MEINHARDT et al., 2008). No Brasil, o estado de Rondônia foi um dos primeiros a ser afetado pela vassoura-de-bruxa, por volta do ano de 1970, causando perdas de 50% de sua produção dentro de 6 anos. No sul da Bahia, *M. perniciosa* chegou por volta do ano de 1989 e as perdas para a cacauicultura nesse estado chegou a 60% entre os anos de 1990 a 1995

(PLOETZ, 2007) e causou perdas de 200000 empregos, o que gerou o abandono das muitas fazendas produtoras de cacau (GRIFFITH et al., 2003).

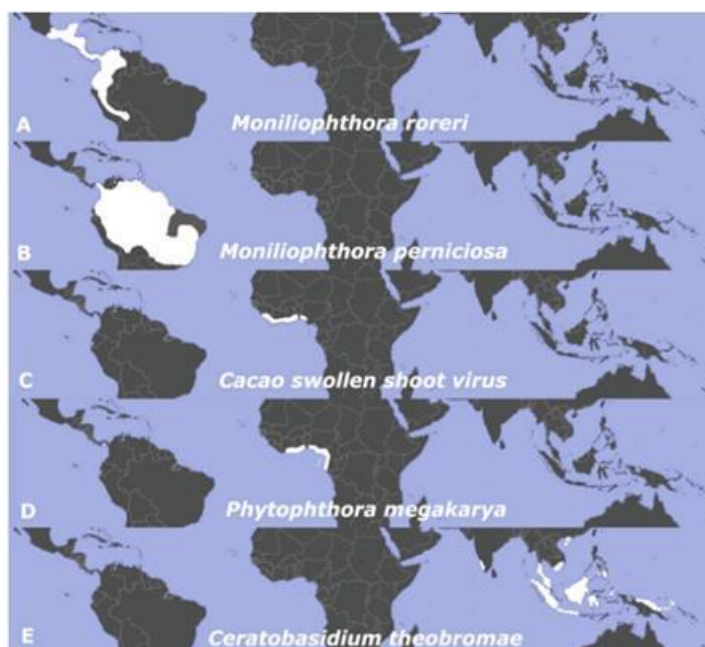


Figura 1 – Distribuição geográfica dos principais fitopatógenos do cacaueiro. **A.** *Moniliophthora roreri*, causador da monilíase. **B.** *Moniliophthora perniciosa*, causador da vassoura-de-bruxa. **C.** *Cacao swollen shoot virus*. **D.** *Phytophthora megakarya*, causador da podridão-negra. **E.** *Ceratobasidium theobromae* (vascular streak dieback). De acordo com BRYAN A. BAILEY LYNDEL W. MEINHARDT (2016).

Com a doença no país, o Brasil que era o terceiro maior produtor de cacau (347000 toneladas entre os anos de 1988-1990), reduziu tanto sua produção que chegou a importar de 141000 toneladas do amendoim entre 1998 e 2000 (MEINHARDT et al., 2008). Dados de 2012 mostram que o Brasil é o 6 maior produtor de cacau do mundo, e já esteve na terceira colocação. De acordo com a Figura 1, a vassoura-de-bruxa é um problema nas américas central e sul, não afetando países produtores da África (o maior produtor de cacau, Figura 2) nem da Ásia (BRYAN A. BAILEY LYNDEL W. MEINHARDT, 2016). Nesse sentido *M. perniciosa* tem potencial para se tornar um problema ainda maior, se chegar alcançar esses continentes.

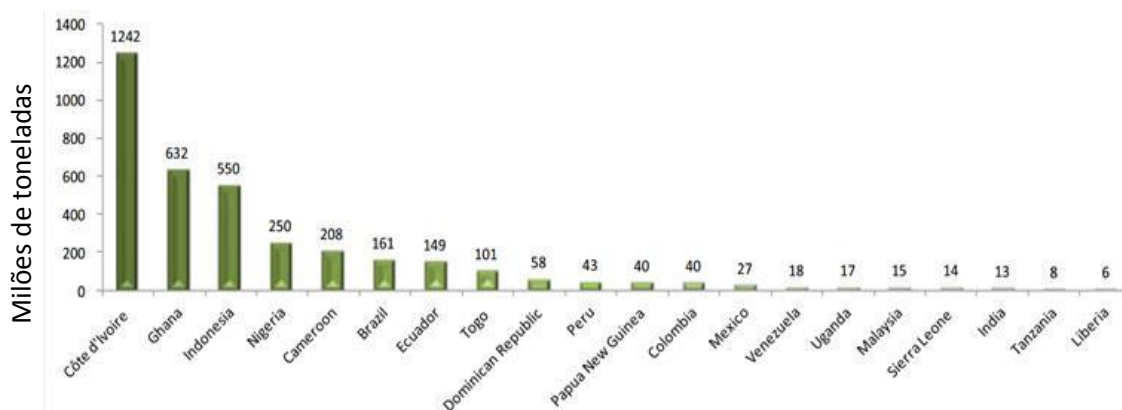


Figura 2. Ranking dos 20 países que mais produziram cacau entre os anos de 2010-2011. (BRYAN A. BAILEY LYNDEL W. MEINHARDT, 2016)

Com todo o contexto de perda na produção de cacau devido à vassoura-de-bruxa, muitos esforços já foram direcionados, na tentativa de amenizar esse problema. Dentre as alternativas de controle da doença, destacamos o controle genético, cultural, químico e biológico (MEINHARDT et al., 2008). Para o controle genético, a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) buscou desenvolver variedades que equilibrassem resistência e produtividade, para distribuir aos produtores (PINTO; PIRES, 1998). Porém, *M. pernicioso* apresenta alta variabilidade genética e alta taxa evolutiva, fatos que dificultam o estabelecimento de uma cultivar de cacau que resista à todos os isolados do fungo (DE ARRUDA et al., 2003; HEDGER; PICKERING; ARAGUNDI, 1987). Devido a essa alta variabilidade tem sido observado que o fungo tem conseguido suplantar a resistência de diversas cultivares de cacau.

Desse modo, o controle genético passa a não ser tão eficiente, sendo necessário associá-lo a outros métodos como o controle químico, biológico e tratos culturais. A aplicação de agentes químicos no controle *M. pernicioso* pode ser realizada com a utilização de fungicidas, como tebuconazole e outros do grupo estrubilurinas como azoxystrobina (CRUZ et al., 2013; KANEKO; ISHII, 2015; OLIVEIRA; LUZ, 2005). Apesar disso, o uso de fungicidas exige uma aplicação periódica e muitos deles afetam o desenvolvimento dos tecidos vegetativos da planta, bem como a produção dos frutos, pelo fato de possuírem cobre em sua composição (BRUN; CORFF; MAILLET, 2003). Uma alternativa ao controle químico, que pode ser associada ao uso de variedades resistentes, é o emprego do controle biológico como a utilização de fungicidas a base de microrganismos antagonistas os *M. pernicioso*. Dentre os fungos conhecidos como micoparasitas de *M. pernicioso* encontra-se *Trichoderma stromaticum*

(Hypocreales) que vem sendo utilizado na forma do produto TRICOVAB® (OLIVEIRA; LUZ, 2005). Ainda, se destaca como método de controle, a poda fitossanitária, que consiste em eliminar os tecidos infectados da planta. Esse método foi recomendado por Stahel em 1915, e também pode ser associado com os demais, no controle da vassoura-de-bruxa. Porém a poda fitossanitária exige muita mão de obra para suprir a demanda das extensas fazendas de cacau. Assim, apesar dos métodos integrados do controle da vassoura-de-bruxa, estes apresentam algumas limitações que acabam onerando a produção, e que precisamos buscar modos mais eficientes pra combater o *M. pernicioso*.

2.1.2 O ciclo de vida do fungo

Moniliophthora pernicioso é um basidiomiceto da ordem das Agaricales. Esse fungo apresenta hifas com núcleos “masculinos” e “femininos”, sendo assim considerado homotático, possuindo ciclo de vida complexo. Seus basidiósporos (meiócitos) são as únicas formas infectivas do fungo (EVANS, 1980). Eles perdem a viabilidade quando expostos a radiação UV-B e em condições de desidratação. Devido a isso, o potencial de dispersão desses esporos é baixo, sendo a chuva e o vento os principais modos de dispersão (aproximadamente 60 km) (BRYAN A. BAILEY LYNDEL W. MEINHARDT, 2016; MEINHARDT et al., 2008).

Apesar do baixo potencial dispersivo dos esporos de *M. pernicioso*, a infecção de novas plantas é facilitada pelo fato do cacau ser predominantemente cultivado em grandes áreas e em sistemas agroflorestais, como a Cabruca (cacau plantado por baixo da Mata Atlântica). Assim, o processo de infecção ocorre quando os esporos encontram a superfície de tecidos meristemáticos do hospedeiro e quando as condições climáticas são adequadas. Nessas condições, os esporos germinam produzindo hifas mononucleadas que infectam as plantas de cacau penetrando pela base de tricomas em forma de estrela, pelos estômatos ou diretamente por injúrias nos tecidos meristemáticos (EVANS, 1978; PURDY; SCHMIDT, 1996; SENA; ALEMANNO; GRAMACHO, 2014a; SREENIVASAN, T. N.; DABYDEEN, 1978).

Por ter um estilo de vida hemibiotrófico, *M. pernicioso* apresenta pleiomorfismo, com duas fases bem distintas associadas à evolução da doença: fase biotrófica, com micélio monocariótico; fase necrotrófica, com micélio dicariótico (EVANS, 1980). Na fase biotrófica, o fungo desenvolve um micélio monocariótico (hifa primária) que invade o espaço intercelular do hospedeiro. O tecido infectado sofre uma série de modificações como hipertrofia e hiperplasia, e os órgãos vegetativos sofrem perda de dominância apical e aumento da

proliferação dos brotos laterais (vassoura verde). Em seguida, devido às respostas do hospedeiro ao ataque do fungo bem com às condições nutricionais para este se desenvolver (dentre outros fatores), é gerado um ambiente favorável para que o fungo mude da fase biotrófica para necrotrófica, na qual o micélio passa a ser dicariótico, com hifas binucleadas e com grampos de conexão (hifa secundária) (MEINHARDT et al., 2008; PURDY; SCHMIDT, 1996). Essa transição corresponde, na planta, ao estágio de vassoura seca.

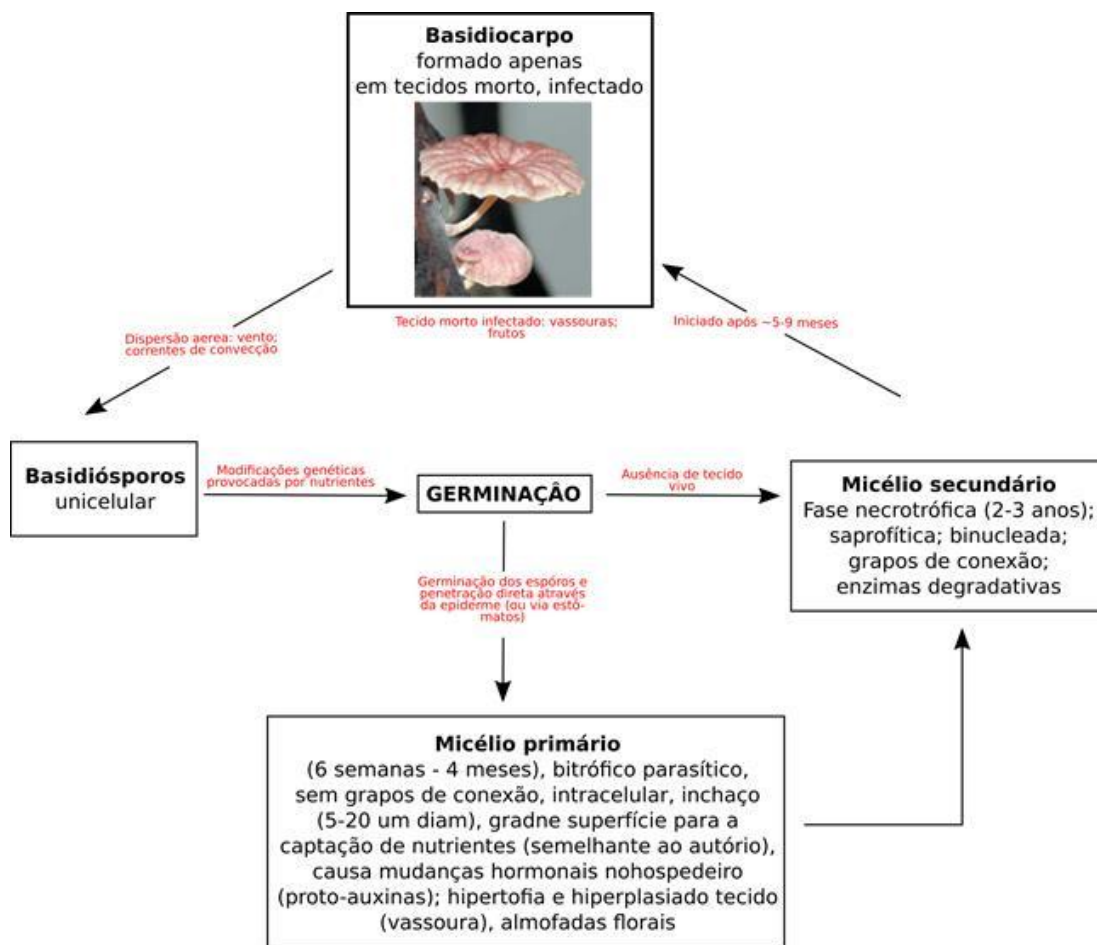


Figura 3. Representação do ciclo de desenvolvimento de *M. perniciosa* em cacau. Adaptado de BRYAN A. BAILEY LYNDEN W. MEINHARDT (2016) e MEINHARDT et al. (2008).

Após se nutrir do tecido morto durante a fase necrotrófica, *M. perniciosa* passa por intensa reorganização de suas hifas e produz suas estruturas reprodutoras emitindo seu corpo de frutificação (basidiocarpo), fechando o ciclo com a produção de seus meiosporângios (MEINHARDT et al., 2008; PIRES et al., 2009; PURDY; SCHMIDT, 1996).

2.1.3 Cultivo *in vitro* de *M. perniciosa*

Tanto na interação com seu hospedeiro quanto no desenvolvimento *in vitro*, *M. perniciosa* pode apresentar micélio mono e dicariótico, sendo que a duração dessas fases são diferentes a depender do sistema no qual o fungo está inserido. Na ausência do tecido do hospedeiro o fungo muda muito rápido da fase monocariótica para dicariótica (24-28 horas), enquanto na presença do hospedeiro, o micélio monocariótico cresce lentamente, podendo durar de seis semanas a quatro meses (DELGADO; COOK, 1976; EVANS, 1980).

O cultivo das hifas de *M. perniciosa* em sistema *in vitro* tem permitido observar peculiaridades. As hifas monocarióticas se desenvolvem em um curto período de tempo, elas se deslocam rapidamente para o estágio de hifas dicarióticas (7-14 dias), no entanto, estudos revelam que esta fase pode ser prolongada usando meio pobre em nutrientes como aqueles que utilizam como fonte de carbono o glicerol (MEINHARDT et al., 2008; SCARPARI et al., 2005). O fenômeno de prolongamento da fase monocariótica, com o uso do glicerol, produz um micélio muito similar ao encontrado na fase biotrófica do fungo (hifas monocarióticas sem grampos de conexão) quando ele coloniza o apoplasto da planta (MEINHARDT et al., 2006). O apoplasto tem sido relatado na literatura como um meio pobre em nutrientes o que reforça a teoria de que a fase monocariótica é dependente de condições não muito ricas em nutrientes (WILSON et al., 2012).

Por outro lado, o micélio dicariótico de *M. perniciosa* apresenta grande plasticidade quando consideramos as modificações que ele sofre para produzir as estruturas reprodutoras. Essas estruturas podem ser obtidas com o cultivo do micélio dicariótico em sistema artificial denominado de “sistema de bolachas” (*bran-based solid medium*) e é formado em sua totalidade, por hifas dicarióticas similares às encontradas no sistema *in vivo*. Esse sistema tem como base farelo de aveia e vassoura seca e minerais, o qual tem sido um modo eficiente para obtenção de basidiocarpos de *M. perniciosa* fora do hospedeiro (ARGÔLO et al., 2013; GOMES et al., 2016; GRIFFITH; HEDGER, 1993). Embora não venha sendo largamente empregado para a obtenção de esporos, o cultivo *in vitro* permite produzir esporos com potencial infectivo, demonstrando a eficiência de métodos *in vitro* para o estudo do desenvolvimento de *M. perniciosa* (BASTOS; ANDEBRHAN, 1987).

O desenvolvimento de *M. perniciosa* durante o cultivo em bolachas mostra fenômenos específicos relacionados com a formação do basidiocarpo. O fungo precisa de condições de estresse e um ambiente com poucos nutrientes disponíveis, para produzir tais

estruturas, que podem ser obtidas limitando a água no sistema (ARGÔLO SANTOS CARVALHO et al., 2013; GOMES et al., 2016). Nesse sentido, o cultivo de *M. pernicioso* no sistema de bolachas mostra intensas modificações tais como mudanças na coloração do micélio, realocação de nutrientes, e rearranjo das hifas através do processo de anastomose (fusão das hifas) levando à formação do primórdio (BASTOS; ANDEBRHAN, 1987; GOMES et al., 2016; GRIFFITH; HEDGER, 1993; PIRES et al., 2009; PURDY; DICKSTEIN, 1990).

Embora a produção das estruturas reprodutoras de *M. pernicioso*, em condições *in vitro*, seja difícil, muitos autores conseguiram obter basidiocarpos desse fungo nessas condições (GOMES et al., 2016; PIRES et al., 2009; PURDY; DICKSTEIN, 1990). Um dos pontos importantes a ser considerado é que a produção dos esporos a partir dos basidiocarpos do cultivo *in vitro* não afeta seu potencial de virulência, revelando que o cultivo artificial, não interfere na capacidade de infecção (PICKERI; HEDGER, 1987).

Assim, o cultivo *in vitro* se mostra muito eficiente para a compreensão do desenvolvimento de *M. pernicioso* e o impacto dos estímulos sob ambiente controlado, em vários processos biológicos: proliferação de hifas, divisão celular, formação de septo de hifas, resposta a diferentes tipos de estresse, formação do corpo de frutificação, entre outros processos (ARGÔLO SANTOS CARVALHO et al., 2013; GOMES et al., 2016; PIRES et al., 2009; PUNGARTNIK et al., 2009a).

2.1.4 Os biótipos de *M. pernicioso* e seus hospedeiros

Além da sua ampla distribuição geográfica nos países produtores de cacau das Américas, *M. pernicioso* se torna ainda mais complexo devido a sua diversidade genética. O fungo tem a capacidade de infectar diversos grupos de hospedeiros: Malvaceae, Malpighiaceae, Bigoniaceae e Solanaceae; de acordo com esse potencial, *Moniliophthora pernicioso* é dividido em quatro biótipos: C, H, L e S, respectivamente (Tabela 1) (BASTOS, C N; EVANS, 1985; GRIFFITH; HEDGER, 1994; HEDGER; PICKERING; ARAGUNDI, 1987; MARELLI et al., 2009; MEINHARDT et al., 2008).

Table 1 Summary of the pathogenicity of the biotypes and their genetic diversity.

	Hospedeiro	Diversidade genética
Biotipo C	<i>Theobroma</i> and <i>Herrania</i> spp. (Malvaceae)	Vários isolados foram encontrados*
Biotipo H	<i>Heteropterys acutifolia</i> (Malpighiaceae)	Reclassificado em uma nova espécie <i>Crinipellis</i>
Biotipo L	<i>Arrabidaea</i> spp. (Bignoniaceae)	Diversidade extrema
Biotipo S	<i>Solanum</i> spp. (Solanaceae)	Vários isolados foram encontrados*

* Indica que os isolados tendem a ter uma orientação geográfica, sendo a maior parte da diversidade genética associada a isolados de diferentes origens geográficas (MEINHARDT et al., 2008).

2.1.5 Era genômica e pós-genômica do fungo *M. pernicioso*

Considerando o impacto socio-econômico causado pela vassoura-de-bruxa e as limitações dos métodos de controle da doença, muitos esforços têm sido investidos em estudos moleculares voltados tanto para genômica como para transcriptômica e proteômica (chamadas globalmente de “Ômicas”). O genoma de *M. pernicioso*, publicado por Mondego e colaboradores (2008), revelou um tamanho entre 38,7-39 Mb, muito próximo ao genoma de espécies como *Coprinopsis cineria*, também da ordem Agaricales, que apresenta um genoma de 37,5 Mb. Alta similaridade também foi detectada com outros basidiomicetos, como *Laccaria bicolor* e *Phanerochaete chrysosporium* (KÜES; NAVARRO-GONZÁLEZ, 2010). O número de genes preditos para *M. pernicioso* foi de 16 392, sendo que 11 349 deles apresentaram alta similaridade com o dados disponíveis no *GenBank* (MONDEGO et al., 2008).

Os avanços nos estudos Ômicos de *M. pernicioso* possibilitaram entender melhor a expressão de genes do fungo em diferentes estágios de desenvolvimento (estágios biotrófico e necrotrófico) (GOMES et al., 2016; PIRES et al., 2009) como também na interação com seu hospedeiro (GESTEIRA et al., 2007; SCARPARI et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2014). Esse fungo possui genes que se destacam em relação a processos de detoxificação, degradação de parede celular, resistência a espécies reativas de oxigênio (ERO), dentre outros. Esses genes mostram o potencial de *M. pernicioso* para lidar com o ambiente do hospedeiro (e.g. barreiras físicas e químicas) (GOMES et al., 2016; MONDEGO ET AL., 2008; PUNGARTNIK et al., 2009a; SCARPARI et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2014).

2.2 Desenvolvimento fungico e resposta a estresse

2.2.1 Sinalização celular

De modo geral, os fungos, bem como todos os seres vivos, reagem ao ambiente externo e respondem aos mais diversos estímulos, como mudança de pH, temperatura, mudança da osmolaridade do meio, substâncias oxidantes, escassez de nutrientes, dentre outros. Para isso

são necessárias vias de sinalização que possibilitem o organismo em perceber e reagir aos mais diversos estímulos bióticos e abióticos. Dentre as vias de sinalização conhecidas, as mais bem estudadas em fungos filamentosos, são aquelas relacionadas com Guanosine TriPhosphate-Binding protein (GTPase monomérica e proteína G heterotrimérica), Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK), Adenosina Monofosfato Cíclico (cAMP), cálcio, Target Of Rapamycin (TOR) e sinalização via pH (KATHERINE. A. BORKOVICH, 2010).

2.2.2 Via GTPase

2.2.2.1 Via GTPases monoméricas

A via das GTP-*Binding protein* (GTP-Bp) é muito importante em diversos processos celulares como morfogênese, polaridade, movimento e divisão celular (JAFTE; HALL, 2005). Dentro desse grupo de proteínas, encontram-se as GTPases monoméricas, representadas por proteínas da subfamília Ras e RasHomologo (Rho), envolvidas na transdução de sinal em levedura e fungos filamentosos. A subfamília Rho em fungos é representada por RHO, Cell Division Cycle 42 (CDC42) e RAC, que além das funções já citadas, desempenham importante papel no crescimento filamentoso e patogênese em fungos (JAFTE; HALL, 2005; SUDBERY, 2008). Por serem proteínas do tipo GTP-Bp, sua ativação depende da troca de uma molécula de Guanina Difosfato (GDP) para uma Guanina Trifosfato (GTP), mudando a proteína de uma forma inativa para ativa, respectivamente. Essas trocas dependem da atuação de proteínas Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF) (BORKOVICH; EBBOLE, 2010; MADDEN; SNYDER, 1998), que são proteínas responsáveis por realizar a troca de uma molécula de GDP para GTP. Além disso, as proteínas RHO possuem a atividade de GTPase, sendo capaz de converter GTP para GDP, o que lhes confere a capacidade de fornecer grupos fosfatos para ativar outras proteínas.

RHO1 é uma das GTPases que regula processos marcantes para morfogênese, virulência e síntese de glucano, bem como a expressão de genes relacionados com biossíntese de parede em fungos (GUARRO; PIETRO, 2008; QADOTA, 1996). Os impactos da atuação de RHO1 na célula, bem como de outras GTPases, estão relacionados com seu potencial regulatório de vias como a MAPK pela ativação da Protein Kinase C (PKC1). A via MAPK é uma cascata de proteínas serina/treonina quinase que está relacionada com a regulação de uma gama de processos dentro da célula: proliferação celular, diferenciação, apoptose, resposta a estresse (PLOTNIKOV et al., 2011). Também é relacionada com a integridade e organização

da parede celular de fungos, na qual PKC tem papel central na ativação de proteínas relacionadas com a síntese de quitina (FUCHS; MYLONAKIS, 2009a; LEVIN, 2011). A ativação de MAPK por RHO1 é indireta e se dá pela ativação de PKC1 (NONAKA et al., 1995). Além disso, RHO1 faz parte da subunidade reguladora com complexo glucano sintase, sendo assim, a biossíntese de glucano na célula é dependente da ativação do complexo RHO1, via fosforilação (QADOTA, 1996).

Por outro lado, CDC42 é considerado um regulador mestre do processo de polarização celular e se destaca junto com RHO1, ambos estando associados com o fenômeno de polarização celular (PEREZ; RINCÓN, 2010). A literatura tem mostrado que CDC42 age junto com a RAC1, e tem como principal função a formação de septos, enquanto RAC1 tem papel marcante na morfogênese das hifas (BORKOVICH, KATHERINE A. EBBOLE, 2010b).

2.2.3 Via de sinalização TOR

A sinalização celular via Target Of Rapamycin (TOR) é a principal via responsável por responder as variações na célula dos nutrientes, como o nitrogênio. Seu principal constituinte é a proteína phosphatidylinositol 3-kinase, TOR. Essa via é muito conservada em eucariontes e tem como principais elementos os complexos TOR (TORC1 e TORC2), que são muito bem documentados e caracterizados na literatura. Em *Saccharomyces cerevisiae* os dois complexos estão presentes (LOEWITH; HALL, 2011).

O complexo TORC1 tem sido documentado como sensível a rapamicina, que é uma droga responsável por inibir a via TOR fazendo com que o organismo não perceba a condição de falta de nutrientes (FUCHS; MYLONAKIS, 2009a). Esse complexo desempenha importante papel na célula, nos processos de síntese de proteínas, degradação e síntese de ribossomos, síntese de mRNA e autofagia. Por outro lado o complexo TORC2, em *S. Cerevisiae*, não é sensível a rapamicina e está relacionado com processos como o controle da polimerização da actina e a manutenção da integridade da parede celular (LOEWITH et al., 2002). Esses dois complexos têm diferentes composições em suas subunidades. O complexo TORC1 de *S. cerevisiae* contém TOR1 ou TOR2, Kog1, TCO89 (ADAMI et al., 2007) e LST8, enquanto o complexo ScTORC2 contém TOR2, LST8, AVO1, AVO2 e AVO3 (LOEWITH; HALL, 2011; WULLSCHLEGER et al., 2005). Dentre os representantes dos basidiomicetos, *Pleurotus ostreatus* foi identificado tendo os dois complexos, porém, não foi identificado em seu genoma

o gene para a subunidade TCO82 no complexo TORC1, enquanto no complexo TORC2, foram encontrados as subunidades TOR2, LST8, AVO1 e AVO3 (SHERTZ et al., 2010).

2.2.4 Parede celular de fungos: síntese e manutenção da integridade

Os fungos possuem uma parede celular que é essencial para a viabilidade de suas células, para os processos de morfogênese, desenvolvimento filamentosos, patogenicidade, dentre outros (LEVIN, 2011). A síntese e manutenção dessa parede é feita por proteínas associadas a uma via de sinalização *Cell Wall Integrity* (CWI), responsável por sinalizar para a síntese dos constituintes da parede celular. A via CWI também é responsável por sinalizar danos na parede e consequente reparo desses danos. Essa via, como muitas outras, possui receptores de reconhecimento de sinais do estresse (WCS1, WCS2, WCS3, MID1 e MTL1) e de modo geral esses receptores transmitem o sinal para RHO1 GTPase, através do GEF ROM2/1, que desencadeia uma série de sinais na célula que vão desde a ativação de proteínas via fosforilação até a ativação da expressão de genes relacionados à síntese dos compostos da parede celular, via ativação de fatores de transcrição (LEVIN, 2011).

A estrutura da parede celular de fungos é muito complexa e cada fungo possui uma parede celular muito peculiar em relação a seus padrões moleculares, porém existe uma composição básica que é comum a todos eles. As principais moléculas encontradas na parede celular dos fungos são: quitina, glucano, glicoproteínas e manano (BOWMAN; FREE, 2006). A quitina é um polissacarídeo do tipo homopolímero, com cadeia linear constituído por monômeros de β -1,4-N-acetilglucosamina (GlcNAc). A unidade monomérica do GlcNAc é a UDP-GlcNAc. Embora a quitina seja um carboidrato importante para os fungos, ela representa apenas 1-3 % do peso seco da parede celular de fungos como leveduras, sendo que 5% desse valor correspondem à forma desacetilada da quitina (quitosano) (BOWMAN; FREE, 2006; DÍAZ-JIMÉNEZ et al., 2012). Em resposta a estresses, os níveis de quitina na parede celular pode aumentar muito, podendo chegar a 20% do peso seco; essa é uma resposta de emergência da célula para reparar danos não programados na parede celular. Essa resposta rápida na síntese de quitina está relacionada com o fato de existir uma reserva de *Chitin Synthase 3* (CHS3) na face *trans* do complexo de Golgi. Na condição de estresse, a CHS3 é transportada para a membrana plasmática, onde ela desempenhará seu papel na síntese da quitina (LEVIN, 2011; VALDIVIESO et al., 2000). Assim, a CHS3 é a principal responsável pela integridade e resposta rápida de síntese de quitina na célula.

Enquanto a quitina é um dos menores constituintes da parede celular, o glucano é o maior, chegando a variar entre 50-60% do peso seco da parede celular. O glucano também é um carboidrato de cadeia linear, formado a partir de moléculas de UDP-glicose ligadas através de ligações β -1,3 (30-45% da parede), com ramificações β -1,6 (5-10% da parede). Em *Saccharomyce cerevisiae* a síntese de glucano é realizada por proteínas intermembranares que compõem o complexo Glucano Síntase (GS). Esses genes são Fks1, Fks2 e Fks3 (FK506 Sensitive) (KLIS; BOORSMA; DE GROOT, 2006).

A síntese de glucano é regulada por RHO1. Essa GTPase faz parte do complexo GS (DRGONOVA et al., 1996; QADOTA, 1996) ativando-o e permitindo que a síntese de glucano ocorra. Essa ativação só é possível se uma molécula de GDP carregado por RHO1 for trocado por um GTP. Quem faz essa troca é o GEF ROM1/2. Por outro lado, a síntese de glucano, e outros genes relacionados com a síntese dos constituintes da parede celular, são regulados a nível transcricional, também pela ação de RHO1, pelo seu potencial de ativar PKC1 que é a primeira proteínas da cascata MPAK (FUCHS; MYLONAKIS, 2009a; PEREZ; RINCÓN, 2010). O final da via MAPK ativará fatores de transcrição relacionados com a regulação dos genes de síntese de glucano, assim como ocorre na síntese de quitina.

Os processos relacionados com a síntese de parede celular são importantes não apenas para a manutenção dessa estrutura e bom funcionamento da célula, mas também, para o crescimento filamentosos em fungos. Para isso, a célula exige a atividade de enzimas que degradam a parede (glucanases e quitinases) de modo programado. Durante esses processos, as células do fungo tende a degradar regiões de sua parede para permitir o afrouxamento necessário para que o organismo cresça (LEVIN, 2011). Esse processo de crescimento de fungos é coordenado com uma alta atividade do citoesqueleto que atua na organização do filamento de actina, e é nesse contexto que GTP-*Bp* como CDC42 são fundamentais (TAPON; HALL, 1997).

2.2.5 Autofagia

O processo de autofagia é um fenômeno celular programado essencial para o remodelamento das estruturas celulares, balanço dos recursos quando o organismo está sob condição de escassez de nutrientes e é um processo essencial para o crescimento de organismos como os fungos. Através desse mecanismo a célula consegue reciclar suas organelas, macromoléculas não funcionais (e.g. proteínas), dentre outras. Existem basicamente três tipos de processos autofágicos: a microautofagia, macroautofagia e autofagia mediada por

chaperonas (AMC) (GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010; KELEKAR, 2005). No processo de microautofagia, o conteúdo a ser digerido se funde direto ao lisossomo. A AMC é um processo relacionado a reciclagem de proteínas, no interior da célula. Por outro lado, na macroautofagia, vesículas (autofagossomo) contendo o conteúdo a ser digerido, se funde com lisossomos. O resultado dessa fusão gera uma estrutura denominada autolisossomo. A literatura tem atribuído o nome “autofagia” para descrever a macroautofagia. Esse processo é desencadeado em resposta a escassez de nutrientes, como a depleção de nitrogênio e íons (e.g. zinco, manganês, ferro) (POLLACK; HARRIS; MARTEN, 2009).

O processo de autofagia é orquestrado por uma série de genes relacionados à autofagia (genes ATG). As principais vias de regulação desse processo, em condições de estresse, são mediadas por proteínas quinases PI3 da classe I e II, e a via de proteínas G triméricas. Além desses, o processo de autofagia é regulado pela via TOR que é responsável por suprimir os processos autofágicos, impedindo assim o *turnover* de nutrientes no organismo (CHANG et al., 2009).

A escassez de nutriente desencadeia grandes mudanças na morfologia de fungos filamentosos através de processos de apoptose e de macroautofagia (POLLACK; HARRIS; MARTEN, 2009). Em basidiomicetos, essas mudanças podem ser relacionadas com produção pelo fungo das suas estruturas reprodutoras (e.g. basidiocarpo e basidiosporos) (GOMES et al., 2016; PIRES et al., 2009; POLLACK; HARRIS; MARTEN, 2009; PUNGARTNIK et al., 2009a; SANTOS; BRENDDEL; PUNGARTNIK, 2008)(GOMES et al., 2016; PIRES et al., 2009; POLLACK; HARRIS; MARTEN, 2009; SANTOS; BRENDDEL; PUNGARTNIK, 2008).

2.3 Estudos de biologia de sistemas

A vida é uma condição que depende da organização sistemática de moléculas químicas, originando propriedades que sustentam a ordem existente nos sistemas vivos. Estudos que levam em conta não apenas seus componentes isolados, mas também, um grau maior de complexidade dentro de um sistema, podem revelar pontos centrais potencialmente utilizáveis como alvos de controle do processo fisiológico estudado. A identificação desses alvos pode ser feita com a integração de dados Ômicos.

A introdução de ferramentas Ômicas em estudos de genética, possibilitaram a identificação de biomoléculas (DNA, RNA, proteínas, metabólitos) responsáveis por

características gerais e pontuais para os mais diversos grupos e espécies de organismos vivos e responsáveis pelas características e propriedades desses seres. Nesse contexto, a biologia de sistemas é uma área que vem crescendo para integrar o crescente volume de informações gerada por aquelas ferramentas (BONATTO; NAKAYA, 2016; BREITLING, 2010). A biologia de sistemas é um abordagem interdisciplinar que se baseia no estudo das complexas interações que ocorrem em um sistema biológico, focando nas interações entre suas moléculas como ponto de partida (BREITLING, 2010; SAUER U.; ZAMBONI, 2007). Esse ponto de partida tem como base a ideia de que para promover a compreensão de um sistema é necessário decompor esse sistema em partes e o estudo dessas partes permitirá entender o todo. Essa estratégia de estudo é conhecida como abordagem *top-down* (de cima para baixo, ou ainda, do mais complexo para o menos complexo). Ainda, uma outra estratégia empregada pela biologia de sistemas é a abordagem *bottom-up* (de baixo para cima, ou ainda, do menos complexo para o mais complexo) (BONATTO; NAKAYA, 2016). Em ambas estratégias o intuito é entender o sistema, e ambas estratégias devem ser, se puder, complementares. Nesse sentido, a interdisciplinaridade é uma característica marcante da biologia de sistemas, por lançar mão de modelos matemáticos, princípios da engenharia, computação, física, biologia, dentre outras disciplinas, para lidar com o complexo desafio de modelar um sistema vivo (BREITLING, 2010).

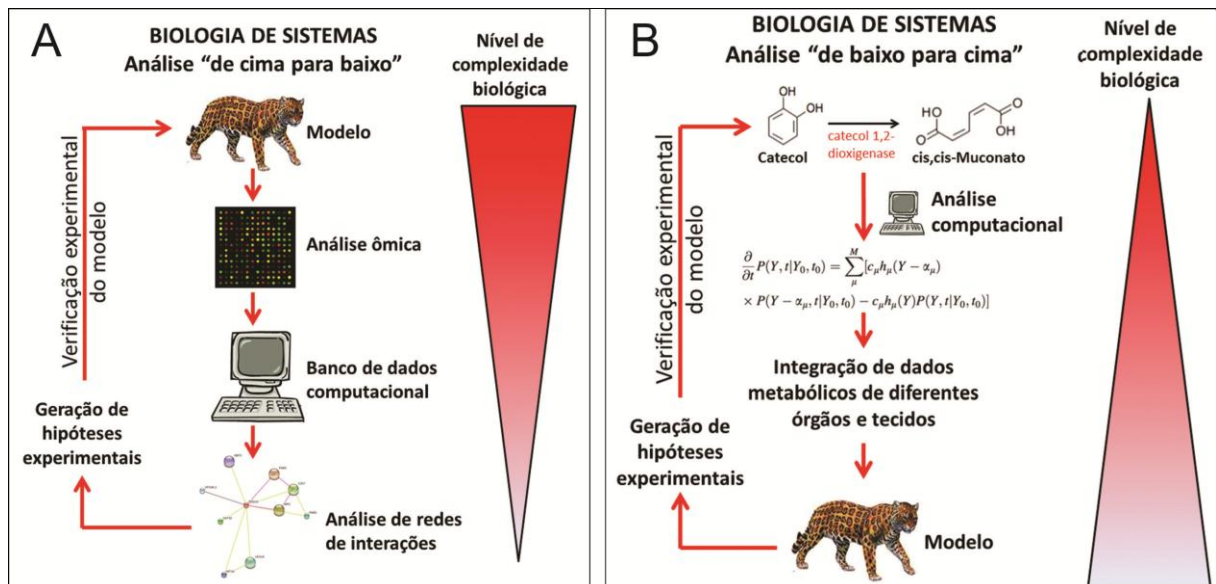


Figura 4. Abordagens empregadas em estudos de biologia de sistemas. **A.** Representação do estudo de cima para baixo (*top-down*). **B.** Representação do estudo de baixo para cima (*bottom-up*). Ambas abordagens seguem um ciclo, sempre com o intuito de obter novas informações sobre o nosso modelo (sistema). Fonte: (BONATTO; NAKAYA, 2016).

Como dito anteriormente, atualmente a biologia dispõe de métodos que permitem decompor um organismo em suas biomoléculas, sendo esse o ponto de partida para estudo de biologia de sistemas *top-down* (BONATTO; NAKAYA, 2016; BREITLING, 2010). Sistemas biológicos são complexos, nesse sentido a biologia de sistemas é fundamental para promover a compreensão das propriedades que emergem da interação das biomoléculas desse sistema, que não pode ser predito apenas com o estudo de suas partes isoladas (BREITLING, 2010). Dada a complexidade desses sistemas, e o vasto número de interações que ocorrem entre suas biomoléculas, a utilização de ferramentas baseadas na teoria de grafos é uma forte aliada para entender o papel das partes e o sistema como todo.

2.3.1 Redes

Sendo uma ferramenta poderosa em estudos de biologia de sistemas, as redes possibilitam resumir uma célula, tecido, órgão, ou organismo a um conjunto de nós (vértices) e conectores (*links*) por onde a informação trafega, representativos das propriedades do sistema (SAADATPOUR; ALBERT, 2013). Assim, redes são teoricamente embasadas na teoria de grafos e apresentam propriedades que permitem distinguir três tipos básicos de redes: i, redes aleatórias; ii, redes livre de escala; e iii, redes hierárquicas (BARABASI; OLTVAI, 2004). Compreender a arquitetura dessas redes é um passo determinante para o desenvolvimento de análises de sistemas complexos.

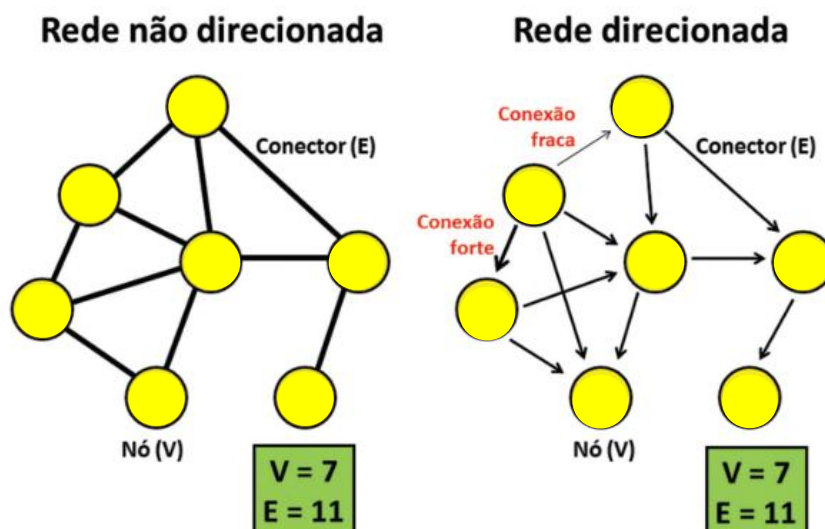


Figura 5. Representação de duas redes (grafos). Na rede direcionada (a direita), as setas indicam o sentido da interação e a espessura da seta denota a força da interação. “V” equivale ao número de vértices (nós) e “E” corresponde ao número de conectores (*edges*). Fonte: (BONATTO; NAKAYA, 2016)

Para compreendermos as propriedades de cada uma das redes citadas acima, precisamos levar em consideração algumas métricas importantes em estudos de redes. Dentre essas métricas destacamos: i. Grau (*degree-k*); ii. Distribuição do grau ($P(k)$); iii. Caminho mais curto (ℓ); e iv. Coeficiente de clusterização (C). As medidas de k e ℓ são valiosas para o estudo de diferentes centralidades em uma rede.

2.3.1.1 Grau (*Degree*)

O Grau (k) é uma métrica direcionada para quantificar o número de conectores de cada nó de uma rede, que equivale ao número de conectores que determinado nó possui realiza em uma rede. O grau de um nó pode ser definido como:

$$C_d(p_k) = \sum_{i=1}^n a(p_i, p_k)$$

onde n equivale ao número de nós encontrados na rede. $a(p_i, p_k)$ é igual a 1 caso exista interação entre o nó i e k , e 0 caso não exista interação entre o nó i e k (ABBASI; HOSSAIN; LEYDESDORFF, 2012a; FREEMAN, 1978).

Essa métrica varia quando comparamos redes direcionadas (nas quais existe sentido da interação) e não direcionadas (as interações não têm direção, sentido) (Figura 5). Nessas últimas temos dois valores para k interações que chegam no nó (k_{in}) e as interações que saem do nó (k_{out}) (JEONG et al., 2000). Por outro lado nas redes não direcionadas temos apenas um valor k , que é empregado para calcular um valor médio de grau $\langle k \rangle = 2L/N$, onde N representa o número de nós da rede não direcionada e L equivale ao número de conectores dessa rede (BARABASI; OLTVAI, 2004).

2.3.1.2 Distribuição de grau

Quando consideramos as conexões que os nós realizam em uma rede, é necessário considerar que existe uma probabilidade de um determinado nó possuir k conexões. Essa

probabilidade é dada pela Distribuição de Grau, $P(k)$. Essa distribuição é uma das métricas mais marcantes para diferenciar os variados tipos de redes (aleatória, livre de escala e hierárquicas) (BARABASI; OLTVAI, 2004).

2.3.1.3 Caminho mais curto (*Shortest path*)

A medida do caminho entre dois nós em uma rede é dada pelo comprimento do caminho (*path length*), a partir dessa medida podemos identificar o caminho mais curto (*Shortest path*) (ℓ) entre dois nós, que é importante para determinar a eficiência da transmissão de determinada informação dentro de uma rede (JEONG et al., 2000; XU et al., 2011). Podemos também considerar um valor médio ($\langle \ell \rangle$) para essa medida, que equivale a uma média de todos os valores (ℓ) para todos os pares de interação em uma rede (BARABASI; OLTVAI, 2004).

2.3.1.4 Coeficiente de clusterização

Os clusters, módulos ou comunidades, são regiões de uma rede que apresentam maior agregação entre si. O coeficiente de clusterização (C) ($C_I = 2n_I/k(k-1)$) de uma rede é uma das propriedades mais relevantes por representar a capacidade que os nós da rede têm de formar módulos. Esse coeficiente parte do princípio de que em uma rede, se A se conecta com B e com C, existe uma alta probabilidade de B também se conectar com C. Desse modo, é possível calcular a probabilidade. Essa métrica segue uma lei de potência, segundo a qual $C(K) \sim K^{-1}$, onde $C(K)$ corresponde a média de C para os nós com K conexões (BARABASI; OLTVAI, 2004; JEONG et al., 2000).

2.3.1.5 Centralidades

Uma consequência das propriedades acima citadas, é que as redes tendem a assumir uma topologia que permite identificar nós com papel de destaque, dentro da rede (POLONI et al., 2014). Esse papel está relacionado com o grau do nó, bem como com a quantidade de informação que trafega por determinado nó, dentre outras. Dentre as centralidades, destacam-se *degree* (grau) e *betweenness* (intermediação).

Degree

A ideia de centralidade em redes surgiu em estudos de redes sociais, trazendo a ideia de que em grupos sociais existem pessoas que são mais influentes que outras (BAVELAS, 1948; FREEMAN, 1978). Essa influência é uma consequência clara de propriedades como a de livre de escala. Assim, determinar a centralidade dos nós de uma rede é uma etapa marcante para identificar genes mais influentes ou significantes para o sistema (JEONG et al., 2001; KHURI; WUCHTY, 2015). Em estudo de redes, as centralidades podem ser classificadas em global ou local. Quando consideramos a importância de um nó em relação ao número de conexões estamos falando de papel local (centralidade local). Por outro lado, existem medidas, como o valor de *betweenness* de um nó, que considera a posição estratégica de um nó em relação a arquitetura geral da rede ; nesse caso, falamos em centralidade global (SCOTT, 2000).

Uma consequência da propriedade de grau (que é uma centralidade local) é a possibilidade de existir em uma rede (como aquelas de topologia livre de escala), nós que apresentam conectividade acima do valor de $\langle k \rangle$ da rede. Esses nós passam a assumir um papel de destaque, sendo considerados *hub*, e portanto tendem a ser mais importantes para o sistema (BARABÁSI, 2016; BARABÁSI; ALBERT, 1999). Em um sistema biológico, proteínas *hub* são determinantes para o tráfego da informação dentro da rede. Esses nós, quando eliminados da rede, tendem a aumentar o número de passos necessários para que a informação saia de um ponto e chegue a um segundo ponto da rede (ALBERT; JEONG; BARABÁSI, 2000).

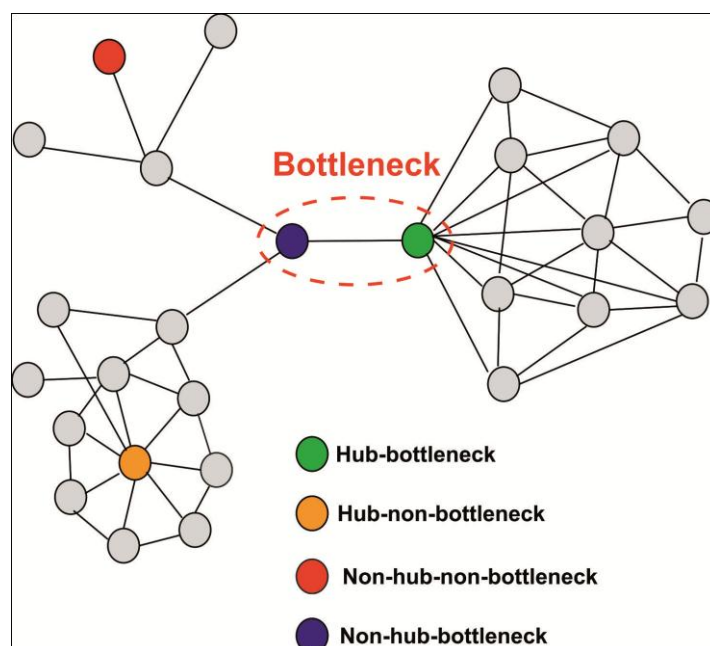


Figura 6. Representação de uma rede, com nós com diferentes centralidades. Nó com grau (*degree*) elevado, são considerados *hub* (nó de cor laranja). Nó com alto valor de grau e alto valor de intermediação (*betweenness*) são considerados *hub-bottleneck* (nó de cor verde). Aquele nó de cor azul é considerado apenas *bottleneck* (gargalo), por possuir elevado valor para intermediação. Por fim, existem nós que possuem baixo valor de grau e de intermediação, esses nós não são considerados tão relevantes para o sistema, e são considerados *não-hub-não-bottleneck* (nós comuns). Fonte: (YU et al., 2007).

Betweenness

Considerando os caminhos percorridos pela informação dentro de uma rede (*Path length*), e quais os caminhos mais curtos (*Shortest path*) (ℓ), é possível determinar a centralidade *betweenness*, que é uma centralidade global. *Betweenness* mensura a quantidade de (ℓ) que passa através de um determinado nó. O valor de *betweenness* pode ser definido como:

$$C_b(n) = \sum \left(\frac{\delta_{st}(n)}{\delta_{st}} \right); s \neq n \neq t$$

onde s e t são nós na rede diferentes de n . δ_{st} indica o número de caminhos mais curtos de s para t , e $\delta(n)$ é o número de caminhos mais curtos de s para t que se encontram em n (FREEMAN, 1978).

Em uma rede, aqueles nós que possuem valor de *betweenness* acima da média, são considerados *bottleneck* (gargalos), indicando que existe muita informação passando por esse nó. Os gargalos vêm sendo considerados verdadeiras pontes dentro das redes, mais relevantes para a rede do que os *hubs* (ABBASI; HOSSAIN; LEYDESDORFF, 2012b; JEONG et al., 2001; YU et al., 2007).

2.3.2 Tipos de rede

2.3.2.1 Redes aleatórias

As redes aleatórias (RA) seguem modelos de redes caracterizados por Erdős-Rényi (1960). Essas redes possuem N nós conectados de modo aleatório, onde cada par de interação ocorre com a probabilidade p . Desse modo, essas redes possuem $pN(N - 1)/2$ nós conectados aleatoriamente. Uma implicação dessa propriedade é que as redes aleatórias seguem uma distribuição de Poisson, apresentando nós com grau (número de conexões) muito próximo da

média da rede $\langle k \rangle$; nós com alto grau são muito raros. Desse modo, uma das maiores características dessas redes é que $P(k)$ e $C(K)$ seguem uma lei de potência (BARABÁSI; OLTVAI, 2004). RAs não são muito importantes para as redes que observamos em nosso cotidiano.

2.3.2.2 Redes livre de escala

Ao contrário das redes aleatórias, as redes livres de escala (RLEs; *scale-free*) são mais importantes para as redes que observamos no mundo real, inclusive para os sistemas biológicos. Em um organismo podemos ter redes de transdução de sinal, redes de regulação de genes, redes de interação proteína-proteína (PPI) e redes metabólicas. Quando falamos em redes biológicas, precisamos levar em consideração as propriedades que essas redes possuem, que são características para a topologia livre de escala.

Segundo Barabási & Albert (1999) a raiz evolutiva das RLEs está relacionada com dois princípios básicos: i. as redes são capazes de crescer (propriedade de crescimento) pelo surgimento de novos nós, originados, por exemplo, da duplicação gênica, transferência gênica, etc; ii. existe uma ligação preferencial de nós (*preferential attachment*), segundo a qual um novo nós adicionado à rede tende a se conectar com nós que são mais conectados, sendo essa uma propriedade conhecida entre estudiosos de redes como o princípio do “rico fica cada vez mais rico” (ABBASI; HOSSAIN; LEYDESDORFF, 2012a; BARABÁSI, 2015; BARABÁSI; ALBERT, 1999). Devido a esse fato, proteínas altamente conectadas, tendem a aumentar o seu grau de conectores ao longo dos processos evolutivos. Com isso, as redes biológicas (RLEs) possuem propriedades específicas: i. seguem uma lei de potência (*power-law*); ii. podem ser direcionais ou não direcionais; iii. são livre de escala; iv. os nós da rede têm a capacidade de se agrupar; e v. apresentam efeito de pequeno mundo (*small-world effect*) (JEONG et al., 2000).

As redes biológicas têm uma $P(k)$ que segue uma lei de potência ($P(k) \sim K^{-\gamma}$), onde $\gamma < 1$. Essa propriedade coloca os sistemas biológicos sob o controle de robustos fenômenos auto-organizados que vão além das particularidades das peças individuais. Essas redes apresentam muitos nós com poucas interações e poucos nós muito conectados, seguindo uma distribuição de Poisson e dando origem à topologia livre de escala, que é característica das redes biológicas (BARABÁSI; ALBERT, 1999). Essas características devem ser levadas em consideração para a seleção de alvos para inibidores (JEONG et al., 2001) devido à alta resiliência dessas redes.

2.3.2.3 Redes hierárquicas

Como já exposto e vale a pena ressaltar, as RAs não têm relevância no mundo real, muito menos no contexto dos sistemas biológicos, porém, as RLEs, e aqui nesse tópico, as redes hierárquicas (RHs), têm destaque para o nosso cotidiano e claramente, nos sistemas vivos. Essas redes possuem nós conectados de modo denso formando regiões densamente conectadas (clusters ou módulos) e nós *hub* que fazem a conexão entre módulos; na arquitetura hierárquica, tanto $P(k)$ quanto $C(k)$ seguem uma lei de potência.

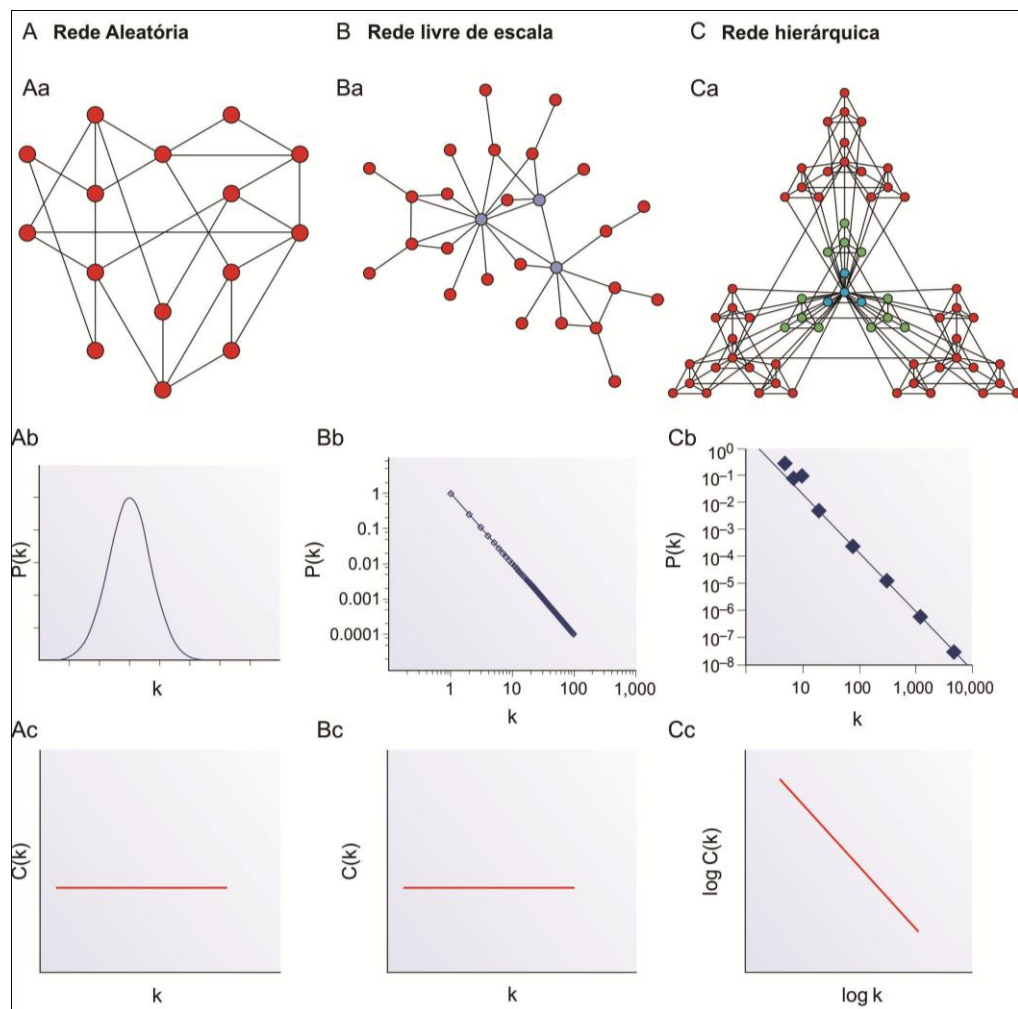


Figura 7. Diferentes modelos de redes e suas propriedades. **A.** Modelo aleatório (Ab), segundo o qual os nós possuem em média o mesmo número de conectores, seguindo uma distribuição de Poisson (Ab); nessas redes $C(K)$ não tem relação com k (Ac). **B.** Modelo livre de escala; esse modelo segue uma lei de potência que possibilita a existência de poucos nós muito

conectados e muitos nós com poucas conexões (nós azul em Ba), a probabilidade de um nó ter muitas conexões é muito baixa (Bb); nessas redes $C(K)$ também não tem relação com k . C. Modelo hierárquico no qual existem nós conectados de modo denso formando regiões densamente conectadas (módulos) e nós *hub* que fazem a conexão entre módulos (Ca). Fonte: (BARABASI; OLTVAI, 2004).

2.3.3 Métodos para identificação e predição de interação proteína-proteína (IPP)

Atualmente muitos métodos experimentais são empregados para identificar redes de interação proteína-proteína (IPP), como por exemplo, o método de duplo híbrido (*yeast two-hybrid system*-Y2H), cromatografia de afinidade e imunoprecipitação (GAVIN et al., 2002; HARRINGTON; JENSEN; BORK, 2008; PHIZICKY; FIELDS, 1995; QI; NOBLE, 2011). Em contrapartida, esses métodos possuem limitações, a exemplo, eles não são capazes de identificar as interações para todas as proteínas de um organismo e podem identificar interações que nunca acontecem em um sistema vivo, devido ao fato de que as moléculas envolvidas estão localizadas em compartimentos diferentes. Desse modo, métodos computacionais podem ser utilizados com o intuito de identificar IPP usando as sequências dos aminoácidos de todas as proteínas de uma determinada espécie (SKRABANEK et al., 2008).

Dentre as abordagens computacionais empregadas no estudo das IPPs encontra-se o perfil filogenético (*Phylogenetic Profile*) que busca identificar proteínas que interagem, com base na ideia de que se duas proteínas são herdadas juntas e porquê de algum modo elas estão relacionadas (HUYNEN; BORK, 1998; MARCOTTE et al., 2014). O método de vizinhança genômica (*t*) parte do princípio de que se genes apresentam localização muito próxima no genoma, e que essa proximidade é conservada entre os genomas, então as proteína codificadas por eles devem interagir (HARRINGTON; JENSEN; BORK, 2008). Um terceiro método tem como base o sistema *operon* das bactérias, que são genes expressos no mesmo mRNA, sendo considerados genes fundidos (*Gene Fusion*) e geralmente participam da mesma via, logo, têm relação de interação (ENRIGHT et al., 1999; LEE et al., 2008). O método de co-evolução de sequências (*Sequence Co-evolution*) busca identificar IPP assumindo que se um par de proteína A e B têm um perfil filogenético semelhante a esse das proteínas C e D, e que as proteínas C e D interagem entre si, logo A e B, também interagem (SATO et al., 2005). Por fim existe o método que se baseia na comparação por similaridade, entre as sequencias do organismo em estudo, contra as sequencias de proteínas que interagem em uma rede proteína-proteína, em seguida as proteínas homólogas encontradas são mapeadas no organismo em estudo para

predizer o interatoma (FLÓREZ et al., 2010; KIM et al., 2008; MATTHEWS et al., 2001; REZENDE et al., 2012; YU et al., 2004).

Métodos como os citados acima têm sido aplicados com sucesso na identificação de alvos para o controle de fitopatógenos, como no fungo da brusone do arroz (*Magnaporthe grisea*) bem como na planta, no sentido de selecionar genes candidatos para a resistência a estresse biótico e abiótico (LIU et al., 2017). Em *Mycobacterium tuberculosis* e *Leishmania major* as abordagens computacionais de redes IPPs também foram aplicadas no sentido de identificar alvos para o controle de doenças causadas por esses patógenos em humanos (CASCANTE et al., 2002; CUI et al., 2009; FLÓREZ et al., 2010; REZENDE et al., 2012). Ainda, muitos trabalhos voltados para a compreensão da biologia de organismos como *Arabidopsis thaliana* e *Homo sapiens* empregaram essas abordagens (HE et al., 2008; JONES et al., 2014; ZHANG et al., 2016) demonstrando que interatômas preditos são alternativas eficazes em estudos de biologia de sistemas.

3 CAPÍTULO I

Desenvolvimento de *Moniliophthora perniciosa*: genes chaves envolvidos na organização da parede celular e autofagia mediada por estresse

Edson Mario de Andrade Silva^a, Sara Pereira Menezes Reis^a, Caio Suzart Argolo^a, Dayane Santos Gomes^a, Ceslaine Barbosa^a, Karina Peres Gramacho^b, Raner José Santana Silva^a,
Fabienne Micheli^{a,c,*}

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

^b Cocoa Research Center, CEPLAC/CEPEC, Itabuna-BA, Brazil

^c CIRAD, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France

* Corresponding author. Fabienne Micheli, UESC, DCB, Rodovia Ilhéus-Itabuna km16, 45662-900, Ilhéus-BA, Brazil. Phone: +55 73 3680 5196. Fax: +55 73 3680 5226. E-mail: fabienne.micheli@cirad.fr

Abstract

Background. *Moniliophthora perniciosa* é o basidiomiceto causador da vassoura-de-bruxa no cacau. Essa doença tem sido um grave problema e ameaça para a indústria do chocolate e para regiões produtoras de cacau. Genes como quitina sintase (Chs), quitinases (Chit) e genes de autofagia (Atg) vêm sendo considerados muito importantes para a biologia desse fungo e relacionados com resposta a estresse. Estudar esses genes a nível sistêmico e através de expressão genica nos possibilitou identificar e compreender a dinâmica de importantes fenômenos celulares durante o desenvolvimento de *M. perniciosa*.

Results. Nesse trabalho, implementamos uma abordagem de mineração de dados da literatura, estudo de rede de interação proteína-proteína (IPP) e expressão genica que nos permitiu identificar atores relacionados com organização da parede celular e autofagia em *M. pernicioso*. Dentre eles, destacamos representantes do complexo TORC2, que se mostrou o mais relevante na resposta a falta de nutrientes nas fases que precedem o desenvolvimento do basidiocarpo. Esse complexo interagiu com importantes genes envolvidos na síntese de parede celular, e na polarização e divisão celular (*MpFks1*, *MpChs*, *MpCdc42*, *MpRom2*). *MpRom2* é um importante hub-gargalo associado com a regulação a jusante de vias de reparo relacionadas a danos e síntese da parede celular. Processos de autólise e autofagia foram associados com *MpChit2*, *MpAtg8* e o complexo TORC1 (*MpTor1* e *MpKog1*). TORC1 é um complexo central na sinalização a jusante para a resposta ao estresse por escassez de nutrientes, autofagia, remodelamento de hifas e regulação de crescimento. Foi sugerido uma estreita relação entre *MpChit2* e o processo de autólise, junto com o complexo TORC1 e ATG8.

Conclusions. Esse trabalho é um dos primeiros relatos que utiliza uma abordagem que integra expressão gênica e redes de IPP para explorar mecanismos celulares importantes para o desenvolvimento de *M. pernicioso*, como a formação do basidiocarpo. Aqui, focamos no estudo de vias como TOR e GTPases (RHO1, ROM2) em relação com a resposta ao estresse e com os seus impactos na organização da parede celular e autofagia. A seleção de alvos (Kog1, Rom2, Tor1, Ssz1, Gdi1, Fks1, Ccd10, Cks1, Cdc42, Rho1, Avo1, Atg8, Chs2, Cts2, Bag7, Cts2) via rede IPP permitiu selecionar elementos que têm maior impacto para o sistema (Tor1, Fks1, Rho1, Cdc42, Rom2 e ATG8) e que participam da formação do basidiocarpo. Tais elementos são bons candidatos para desenvolvimento de estratégia de controle do fungo.

Palavras-chave: Biologia de sistema, basidiomiceto, *Saccharomyces cerevisiae*, organismo modelo.

INTRODUÇÃO

O fungo basidiomiceto *Moniliophthora* (=Crinipellis) *perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005) é responsável por causar a doença vassoura-de-bruxa em plantas de cacau (*Theobroma cacao* L.), uma das mais drásticas doenças nas regiões das América Central e do Sul (BRYAN A. BAILEY LYNDEL W. MEINHARDT, 2016; MEINHARDT et al., 2008). Durante seu cultivo *in vitro* (bolachas), *M. perniciosa* passa por intensas modificações na organização de sua estrutura micelial como ramificação ou, ao contrario, fusão das hifas (anastomose) levando a formação dos primórdios e consequentemente dos basidiocarpos (PIRES et al., 2009). Foi mostrado que a formação dessas estruturas reprodutoras está relacionada com a escassez de nutrientes e de água, e que existe uma relação entre a formação do basidiocarpo, o metabolismo da quitina e a autofagia (PUNGARTNIK et al., 2009a; PIRES et al., 2009; GOMES, 2015; GOMES et al., 2016). Genes de autofagia (*MpAtg8*), de síntese de quitina (*MpChs*) e de degradação da quitina (*MpChit1* e *MpChit2*) foram identificados como elementos chaves do remodelamento das hifas previamente à formação dos basidiocarpos (GOMES et al., 2016; PIRES et al., 2009).

Com base no contexto citado acima, estudo da interação entre proteínas pode trazer novas perspectivas para explicar como aqueles genes atuam para naqueles processos e para o desenvolvimento de *M. perniciosa*, de um modo geral. Diversos trabalhos vêm mostrando que redes de interação proteína-proteína (IPP) como base em homologia com organismos modelo, podem ser utilizadas com sucesso para a compreensão de fases do desenvolvimento de *M. perniciosa* (e.g. degradação de pectina, germinação de esporos; CARVALHO et al., 2013; MARES et al., 2016) bem como da interação desse fungo com seu hospedeiro (DA HORA JUNIOR et al., 2012). Dentre os modelos podendo ser aplicados ao estudo do desenvolvimento

de *M. pernicioso*, encontram-se *Ustilago maydis* e *Saccharomyces cerevisiae* para os quais existe uma grande quantidade de informações disponíveis em bancos de dados apropriados ao estudo (BOTSTEIN; CHERVITZ; CHERRY, 1997; BOTSTEIN; FINK, 2011; ALMEIDDA, 2014; MELO et al., 2015).

No presente trabalho, utilizando abordagens de biologia de sistemas e de biologia molecular buscou-se compreender: (i) quais as proteínas interagindo com MpATG8, MpCHIT1, MpCHIT2 e MpCHS, e envolvidas na formação do basidiocarpo; (ii) quais processos biológicos e celulares estão associados a estas proteínas; e (iii) qual o nível de expressão dos genes que codificam essas proteínas, durante o desenvolvimento de *M. pernicioso*. Para alcançar tais objetivos, foi realizado i) um estudo *in silico* para caracterização estrutural dos genes, construção e análise da rede de IPP e mineração de dados da literatura; e ii) um estudo de expressão gênica de genes chaves para o desenvolvimento de *M. pernicioso* cultivado *in vitro*. Com isso, selecionamos genes que codificam proteínas que são nós centrais para *M. pernicioso*, relacionadas com o controle da comunicação entre grupos de proteínas mais densamente conectadas na rede (JEONG et al., 2001). Dentre esses genes, destacamos GDP/GTP *Exchange factor* (Rom2), componentes dos complexos TORC1 e TORC2 (Kog1, Tor1 e Avo1), Fks1, Rho1 e Cdc24. Esses genes atuam em processos voltados para a organização e regulação da síntese da parede celular, regulação da autofagia, divisão e polarização celular, dentre outros. Ainda, constatamos que MpChit1 e MpChit2 além de atuarem em momentos diferentes do desenvolvimento de *M. pernicioso* (GOMES et al., 2016), se correlacionam com genes envolvidos com processos bem distintos, enquanto MpChit2 tem maior correlação com MpAtg8, MpKog1, MpTor1 e MpGdi1 que são relatados como relacionado a processos de reciclagem de nutrientes e autofagia. MpChit1 tem maior relação com genes envolvidos com organização da parede celular, divisão celular, dentre outros

processos que aqui consideramos como relacionados com o desenvolvimento normal de *M. perniciosa*.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Seleção de alvos: interatomica e mineração de dados no PubMed

Ustilago maydis é um basidiomiceto dimórfico bem conhecido à nível genético, celular e metabólico (MCCANN; SNETSELAAR, 2008; STEINBERG; PEREZ-MARTIN, 2008), e é considerado como organismo modelo da patogênese de fungos (BÖLKER, 2001). Para a seleção dos genes analisados nesse estudado, utilizamos as sequencias das proteínas MpCHIT1 (#ABRE01017587.1), MpCHIT2 (#ABRE01009813.1), MpCHS (#EU154354.1) e MpATG8 (#EU477413.1) para uma busca de ortólogos em *U. maydis*. Para isso foi empregado o método do recíproco *besthit*, selecionando alinhamentos com e-value $> E10^{-10}$ (MORENO-HAGELSIEB; LATIMER, 2008). Os ortólogos para aquelas proteínas, em *U. maydis*, foram utilizados para construção da rede de interação proteína-proteína (IPP), no *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* (STRING) database (<https://string-db.org/>), utilizado esse fungo como modelo. A rede de IPP obtida foi explorada para identificar alvos centrais (hubs e gargalos) que interagissem com MpCHIT1, MpCHIT2, MpCHS e MpATG8. Para isso foram utilizados os *plugins* Centiscape (para centralidade) e BiNGO (para /ontologia gênica) do programa Cytoscape. As proteínas selecionadas na rede de *U. maydis* foram submetidas a mineração de dados no PubMed, *gene ontology* para a seleção dos alvos analisados nesse estudo (FIG. 1). Todos os alvos selecionados foram submetidos a alinhamento local por Blastp, para identificar homólogos em *M. perniciosa*.

2. Homologia entre *Moniliophthora perniciosa* e *Saccharomyces cerevisiae* e rede de interação proteína-proteína

Proteínas homólogas são polipeptídios de diferentes organismos, que possuem ascendência evolutiva comum e geralmente conservam a mesma função biológica, podendo ser parálogas ou ortólogas (PEARSON, 2013). Consideramos que proteínas homólogas são aquelas que apresentam mais similaridade do que o esperado pelo acaso. Assim, dentre os métodos para identificar homólogos podemos destacar a ferramenta BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (PEARSON, 2013). No presente estudo, enquanto *U. maydis* foi empregado como fonte para seleção de alvos, *S. cerevisiae* foi utilizado para explorar os principais processos biológicos relacionados com as proteínas MpCHIT1, MpCHIT2, MpCHS e MpATG8 e com os alvos selecionados de acordo com a metodologia apresentada acima (FIG. 1). Com mais de 50 anos servindo como modelo em pesquisas em genética, *S. cerevisiae* é de longe o organismo com maior volume de informações disponíveis no PubMed, com excelente anotação genômica e é um dos principais modelos para análises em biologia molecular nos eucariotos, incluindo *M. perniciosa*. As proteínas homólogas entre *M. perniciosa* no interatoma de *S. Cerevisiae* foram determinadas por BLASTp utilizado como query 13 939 proteínas anotadas de um novo sequenciamento, não publicado, do biótipo C de *M. perniciosa* (CEPLAC/CEPEC, Bahia, Brasil accession number 4145) e como subject, foram utilizadas as proteínas de *S. cerevisiae* disponíveis no STRING database. O blastp foi implementado localmente em *Shell script* com ponto de corte para identidade (> 20%), e-value (>10E-10) e cobertura (>20%) (PEARSON, 2013). Proteínas com resultados de blast maiores que esses pontos de corte foram consideradas homólogas entre *S. cerevisiae* e *M. perniciosa*. Aqui, utilizamos o interatoma de *S. cerevisiae* obtido no STRING database (<https://stringdb-static.org/download/protein.links.full.v10.5/4932.protein.links.full.v10.5.txt.gz>), a partir do qual foram selecionadas as interações com altíssima confiança (>0.9). Essa rede de interação

foi utilizada para a análise de centralidade e seleção de proteínas que interagem diretamente com todos os alvos até aqui selecionados (centro da FIG. 3 e tabela 2).

2.1. Análise de centralidade

Os genes mais relevantes para o sistema foram identificados por análise de *betweenness* e *degree*. *Betweenness* é uma métrica muito valiosa em redes biológicas, já que permite identificar proteínas que conectam processos biológicos (gargalos), ou seja proteínas que tendem a estar relacionadas com o controle e a comunicação entre outras proteínas da rede (BRANDES; ERLEBACH, 2005; YU et al., 2007). O valor de *betweenness* para cada nó na rede de *S. cerevisiae* foi calculado com a função *betweenness* da biblioteca *Igraph* no R (<https://cran.r-project.org/>). *Betweenness centrality* ($C_b = (n)$) de um vertice $\{v\}$ definido por:

$$C_b(n) = \sum \left(\frac{\delta_{st}(n)}{\delta_{st}} \right); s \neq n \neq t$$

onde s e t são nós na rede diferentes de n . δ_{st} indica o número de caminhos mais curtos de s para t , e $\delta(n)$ é o número de caminhos mais curtos de s para t que se encontram em n .

O valor de *degree* representa o número de nós adjacentes de cada vertice na rede. Essa métrica foi calculada com a função *degree* também no *Igraph*. Os nós com valores acima da média para *betweenness* foram considerados gargalos, os nós acima da média para *degree* foram considerados hubs, e os nós acima da média para ambas as centralidades foram considerados *hubs-gargalos*.

2.2. Análise de módulos funcionais

Comunidades (também chamadas de clusters ou módulos) são regiões de uma rede que se dividem em subgrupos densamente conectados entre si. Identificar módulos em uma rede de IPP é uma etapa essencial para selecionar complexos proteicos relacionados com processos

biológicos de interesse e anotação de função de proteínas. Uma vez que as proteínas de um complexo proteico tendem a participar da mesma função biológica, esse tipo de análise permite prever a função de determinada proteína com base no complexo no qual ela se encontra (BADER; HOGUE, 2003; CLAUSET; NEWMAN; MOORE, 2004). Nesse trabalho, um algoritmo baseado em *greedy optimization of the quantity (modularity)* (BADER; HOGUE, 2003; CLAUSET; NEWMAN; MOORE, 2004; NEWMAN, 2003) foi utilizado para identificar módulos, focando apenas nas interações de primeiro grau (interações diretas) com as proteínas selecionadas para a análise de expressão gênica (Tabela 1). Para isso, a rede obtida foi analisada no program R, com a função *graph.data.frame* para redes não direcionada (*directed = FALSE*) e em seguida foi realizada a análise de módulos com a função *fastgreedy.community* (NEWMAN, 2003) no pacote *Igraph*.

2.3. Gene ontology analysis

Para avaliar os processos biológicos *over represented*, os clusters identificados pelo *fastgreedy.community* foram selecionados e analisados no Cytoscape 3.6.0, com o *plugin Biological Network Gene Ontology* (BiNGO) (MAERE; HEYMANS; KUIPER, 2005). No BiNGO foi realizada a análise de enriquecimento funcional e de valor de significância (*p-value*) utilizando a distribuição hipergeométrica (RIVALS et al., 2007), com correção para comparações múltiplas usando o teste de *False Discovery Rate* (FDR), com um nível de significância ($p < 0,05$) (BENJAMINI et al., 2001; BENJAMINI; HOCHBERG, 1995; GOMES et al., 2016).

3. Caracterização estrutural de domínios funcionais de proteínas em *M. perniciosus*

Os domínios de uma proteína são unidades funcionais e/ou estruturais distintas que carregam consigo a sua função não dependente do restante da proteína. Múltiplos domínios

representam múltiplas funções (FINN et al., 2008; MARCHLER-BAUER et al., 2015). Entendemos que se as proteínas codificadas pelos genes que estudamos, possuem os mesmos domínios daquelas do modelo (*S. cerevisiae* e *U. maydis*), estamos lidando com proteínas homólogas (PEARSON, 2013). Assim, com o intuito de caracterizar os domínios presentes nos alvos selecionados para o estudo de expressão genica, as sequencias de ESTs utilizadas na construção de *primers* (Tabela 2, FIG.1) foram submetidas a alinhamento local por BLASTX usando comando de *Shell script*, contra um banco local de proteínas de um novo sequenciamento (não publicado) do biótipo C de *M. pernicioso* (Mp4145). O *best hit* desse blast foi submetido à análise de domínios funcional no Pfam *database* 31.0 (<http://pfam.xfam.org>) (FINN et al., 2008, 2016) utilizando as configurações padrão (FIG. 1). Uma etapa de validação foi realizada, comparando os domínios presentes nas proteínas encontradas em *M. pernicioso* e nos homólogos identificados nos modelos (*U. maydis* e *S. cerevisiae*) (Material suplementar 1).

4. Análise de expressão genica

Para a análise de expressão gênica por PCR em tempo real (RT-qPCR) foram utilizadas cinco fases do desenvolvimento de *M. pernicioso* (isolado TSH565-VA4 n°WFCC#604 da cultura da coleção 120 da CEPLAC/CEPEC, Bahia, Brasil coordenado pela Dr. Karina P. Gramacho) cultivado em bolachas (fases branca, amarela, rosa, rosa escura e primórdio) como descrito por GOMES et al. (2016). Brevemente, o micélio dicariótico de *M. pernicioso* foi coletado nas diferentes fases de pigmentação e utilizado para extração do RNA total, usando o *RNeasy Mini kit* de acordo as instruções do fabricante (Qiagen). O RNA total foi tratado com *Dnase I–RNase free* de acordo as orientações do fabricante (Thermo Scientific). O cDNA foi sintetizado de acordo as seguintes condições: reação de transcrição reversa a 42°C por 1 hora usando 10 µl do RNA total, mmol/L-1 de cada dNTP, 20 U de inibidor de RNase, 0,5 µg do primer dT₁₈ e 20 U de *Revert Aid TMH Minus M-MuLV* (Thermo Scientific). A

transcrição reversa foi inativada a 70°C por 10 minutos. A primeira fita foi quantificada usando o *GeneQuant* (Amersham Biosciences).

As sequências gênicas selecionadas com base em homologia, domínios, dados da literature e interatômica (Tabelas 1 e 2) foram utilizadas como alvos para estudo de expressão gênica. *Primers* para esses transcritos foram desenhados usando o *software Primer blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e *OligoAnalyse* (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) (Material suplementar 2). O gene *MpActin* (EF066485.1) foi utilizado como endógeno (ARGÔLO SANTOS CARVALHO et al., 2013; GOMES et al., 2016; MELO et al., 2006; PUNGARTNIK et al., 2009b). As reações de qPCR foram realizadas no equipamento ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (SDS) acoplado ao *software* ABI PRISM 7500 SDS (Applied Biosystems). Usamos as configurações padrão. A reação foi realizada para um volume total de 20 µL (250 ng/µL de cDNA, 0.8 µL de cada *primer* 5 µM e 10 µL do *Power SYBR Green Master Mix 2X*). Após desenvolver a RT-qPCR com as condições adequadas de amplificação, foi realizada uma avaliação da formação de dímeros de *primers* e hairpins. Os dados de fluorescência gerados foram submetidos ao servidor Miner para determinar a eficiência da reação bem como o fractional cycle number at threshold (Ct) (SHENG ZHAO; FERNALD, 2009). Para obter o nível de expressão foi empregado o método comparativo Ct ($2^{-\Delta Ct}$) sem referência (controle) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) com quatro repetições técnicas e usando o gene *MpActin* como endógeno (ARGÔLO SANTOS CARVALHO et al., 2013; GOMES et al., 2016; MELO et al., 2006; PUNGARTNIK et al., 2009b). Os valores de Ct de cada gene alvo, para cada fase, foram subtraídos pelos valores de Ct do gene endógeno (*MpActin*) na mesma fase, obtendo assim o valor de ΔCt . Esses valores foram transformados em exponencial, considerando uma eficiência da reação igual a 2 ($2^{-\Delta Ct}$) adaptado de (PFAFFL, 2001). Os valores de $2^{-\Delta Ct}$ para cada gene estudado foram submetidas a análise de correlação de Pearson (r) com a função *cor* no R,

seguido de análise de significância dessa correlação com a função `cor.test`. A correlação de Pearson avalia a relação linear entre duas variáveis X e Y (por exemplo, expressão de dois genes). Essa correlação é expressa através do coeficiente de Pearson (r), onde r varia de -1 a +1, $r > 0$ indica correlação positiva, enquanto $r < 0$, correlação negativa. Ainda, uma análise de hierarchical clustering analysis com heatmap também foi implementada, usando a função *Heatmap* da biblioteca ComplexHeatmap do no R (GU; EILS; SCHLESNER, 2016). Para isso, preferimos utilizar os valores de expressão ($2^{-\Delta Ct}$) dos genes, transformados para desvios padrão em torno da média (Z-score).

5. Integração de dados experimentais, literatura e rede de interação proteína-proteína

Para a obtenção de um *landscape* dos principais fenômenos ocorridos durante o desenvolvimento de *M. perniciosus* cultivado em bolachas, os dados de expressão dos genes selecionados (Tabela 2) foram associados a informações de diferentes bases de dados e aos estudos de interatômica (módulo, processos biológicos e centralidade). Para isso, uma nova mineração de dados na literatura foi realizada nas bases do Uniprot (<http://www.uniprot.org/uniprot/P60953>), *Saccharomyces Genome DataBase* (SDB <https://www.yeastgenome.org/locus/S000004219>) KEGG (OGATA et al., 1999) e PubMed.

RESULTS

1. Seleção de alvos e estudo de sequencias para estudo *in silico* e experimentais

Com base em *U. maydis* e em dados da literatura (Tabela 2 e Tabela 2) selecionamos as proteínas UM00801.1 (Kog1), UM03912.1 (Rom2), UM05734.1 (Rho1), UM00947.1 (Avo1) UM00295.1 (Sca54.25.1-Cdc42), UM00474.1 (Chs2), UM01639.1 (Fks1), UM00756.1 (Gdi1), UM02902.1 (Bag7), UM03210.1 (Cks1), UM03216.1 (Tor1), UM03449.1 (),

UM04261.1 (Cts2) e UM05831.1 (Hsp60), como importantes alvos relacionados com ortólogos a MpATG8, MpCHIT1 e MpCHS (FIG. 2 e Tabela 1), MpCHIT2 não teve ortólogo em *U. maydis*.

Com a busca por homólogos em *M. perniciosus* aos genes supracitados (FIG. 1), encontramos ABRE01015241.1 (Kog1), ABRE01002388.1 (Rom2), ABRE01005366.1 (Tor1), ABRE01022557.1 (Ssz1), ABRE01018442.1 (Gdi1), ABRE01013085.1 (Fks1), ABRE01010224.1 (Ccd10), ABRE01021873.1 (Cks1), Sca54.25.1 (Cdc42), ABRE01017644.1 (Rho1), ABRE01017762.1 (Avo1), EU477413.1 (Atg8), EU154354.1 (Chs2), ABRE01017587.1 (Cts2), ABRE01011675.1 (Bag7), ABRE01009813.1 (Cts2). A relação de homologia pode ser observada na Tabela 1 e FIG. 2.

1.1. Caracterização de domínios funcionais e função biológica de genes em *M. perniciosus*

Todos os genes de *M. perniciosus* foram caracterizados em relação aos domínios presentes em suas proteínas e comparados com os organismos modelo (Material suplementar 1). A Tabela 2 mostra os principais domínios e funções encontrados nas proteínas de *M. perniciosus*, comuns aos domínios presentes nas proteínas de *S. cerevisiae*. Os domínios Raptor_N e um pequeno domínio não caracterizado pelo pfam foram encontrados na proteína codificada por ABRE01015241.1, que tem como homólogo em *S. cerevisiae*, a proteína KOG1. Essa proteína é um importante componente do complexo TORC1. Também, associada a esse complexo a proteína codificada por ABRE01005366.1 apresentou maior similaridade com TOR1, outro integrante desse complexo que foi caracterizado contendo os domínios DUF3385, FAT, PI3_PI4_Kinase e FKBP-rapamycin binding (FRB). Estes três últimos domínios são característicos das proteínas TOR quinases, que são membros da superfamília de fosfatidilinositol 3-quinase (PI-3K) (BOYCE; A., 2006). Relacionada com um segundo

complexo TOR (TORC2), AVO1 de *S. cerevisiae* teve maior similaridade com ABRE01017762.1 (Tabela 2).

Genes relacionados com sinalização e síntese de componentes da parede celular também foram identificados: i. ABRE01013085.1 (FKS1) possuindo o domínio FKS1_dom1 (Tabela 2), que é uma região transmembranar presentes em proteínas da família glucano sintase, relacionado com a síntese de 1,3- β -glucano (OKADA et al., 2010). ABRE01002388.1 apresentou maior similaridade com ROM2, que é responsável por fazer a troca do GDP para GTP (GDP/GTP *exchange factor* [GEF]) em proteínas como RHO1 de *S. cerevisiae*, sendo fundamental para a atividade dessas proteínas. ABRE01002388.1 possui os mesmos domínios de ROM2: DEP (Dishevelled, Egl-10 e domínio Pleckstrin) que são importante no desencadeamento de sinal da membrana para o núcleo celular, bem como o domínio RhoGEF; Pleckstrin Homology domain (PH domain) e CNH domain (Tabela 2).

Nossas análises nos levaram a identificar ABRE01017644.1 de *M. perniciosaque* teve alta similaridade com RHO1 e apresetam os mesmos domínios (domínio Ras). RHO1 é largamente relatana na literatura como sendo excenciam na célula, como reguladora do complexo glucano sintase e regulador *uptream* da via MAPK (ver referencias na tabela 1). Ainda, foi encontrada a proteína ABRE01011675.1 que apresentou homologia com componentes de vias associadas com organização da parede celular, e que teve maior similaridade com BAG7. Ambas possuemo mesmo domínio (RhoGAP), relacionadoaom a fnção de GTPase para Rho. BAG7 é importante para a organização da actina no citoesqueleto e na regulação da síntese da parede celular (Tabela 2) e pode ser imporante na regulação de RHO1, por interagirem no mesmo cluster (FIG.).

Uma *heat shock protein* 70 (HSP70) de *S. cerevisiae*, SSZ1, teve alta similaridade com ABRE01022557.1 de *M. perniciosaque*; ambas apresentaram os domínios BAR_2 e HSP70. A proteína codificada por ABRE01018442.1 apresentou um único domínio, o domínio GDI e

homologia com GDI1 de *S. cerevisiae* que é relatada na literature como relacionada à via de secreção (Tabela 2).

Homóloga à septina CDC10, ABRE01010224.1 apresentou o domínio para essa função. Essa proteína é importante nos processos de septação e divisão celular, no momento da citocinese (Tabela 2). Também relacionada com divisão celular, ABRE01021873.1 codifica uma proteína homóloga para CKS1, que é uma ciclina dependente de quinase relacionada com a modulação do processo de proteólise durante a mitose (Tabela 2). Sca54.25.1 foi considerada homóloga de CDC42 em *S. cerevisiae* e apresentou o domínio RAS característico para essa proteína. CDC42 é uma pequena GTPase importante em processos de sinalização intracelular, na manutenção da polaridade celular, organização do citoesqueleto e do anel de septina (Tabela 2) (GLADFELTER et al., 2002; PEREZ; RINCÓN, 2010; TAPON; HALL, 1997; WEBER et al., 2005).

Os genes estudados por Gomes et al. (2016) também foram analisados. EU477413.1 apresentou homologia com ATG8, bem como o domínio ATG8; EU154354.1, ABRE01017587.1 teve como melhor resultado em *S. cerevisiae* com a proteína Chitin Synthase CHS2 com dois domínios Chitin_synth_1, encontrados pelo Pfam; ABRE01017587.1 e ABRE01009813.1 apresentaram homologia com uma quitinase 2 (CTS2) de *S. cerevisiae*, porém a primeira apresentou apenas um domínio Glyco_hydro_18, enquanto a segunda apresentou 2 domínios Glyco_hydro_18.

A rede obtida para *S. cerevisiae* apresentou 2 313 nós com 64 353 conectores com altíssimo nível de confiança (>0.9) sendo que esse valor varia de 0-1. Nesse interatoma, 1301 proteínas foram consideradas homólogas entre *S. cerevisiae* e *M. perniciosus* (Material suplementar 3). A partir dessa rede foi possível identificar uma sub-rede com 161 proteínas e 558 conectores (FIG. 3), que interagem diretamente com as 15 proteínas estudadas em *M. perniciosus* (Tabela 2).

1.2. Análise de clusters, ontologia genica e centralidade

A análise de módulos realizada com o *fastgreedy.community*, na rede de interação direta com as proteínas mostradas na tabela 2 (genes selecionados para expressão genica), possibilitou identificar nove módulos (FIG. 3). Esses módulos revelaram uma série de processos biológicos através da análise de ontologia genica, que permitiu classificar os diferentes genes selecionados em categorias GO com valor estatístico significativo (< 0.05), que associados ao valor para as centralidades *betweenness* e *degree*, possibilitaram identificar os genes mais relevantes dentre os genes aqui estudados (Tabela 2). O valor médio para a centralidade *betweenness* para a rede geral de *S. cerevisiae* foi de 4502.8 e para *degree* o valor médio foi de 5.58, as proteínas com valores superiores a essa média, foram considerados: i. gargalos (B); ii, hubs (H); iii, hub-gargalo (HB) ou comuns (C), que são aquelas proteínas que apresentaram valores para essas centralidades abaixo da média.

As proteínas KOG1, AVO1, TOR1 e CDC10 fazem parte do mesmo cluster, que o BiNGO mostrou estar relacionado com os processos de regulação do crescimento celular, organização da parede celular e a via Target Of Rapamycin (TOR) (FIG. 3-A). Dentre eles, TOR1 foi considerado um Hub-gargalo.

As proteínas BAG7, RHO1, ROM2 e CDC42 foram agrupadas num mesmo cluster (FIG. 3-D). Esse cluster, assim como o FIG. 2-A, teve grande concordância entre a análise de módulos funcionais e os processos de ontologia genica, pois permitiu agrupar proteínas intimamente relacionadas, que participam das mesmas vias, como nos processos de transmissão de sinal via GTPase, divisão celular, organização da parede celular e crescimento.

O metabolismo de dois dos componentes da parede celular (quitina e glucano) foi representado por CHS2, que está relacionada com a biossíntese de quitina e foi anotado pelo BiNGO como envolvida com o processo de citocinese. Na rede, a degradação de quitina foi

representada por CTS2 (FIG. 3-B, C e I) que tem similaridade alta com as duas quitinases de *M. perniciosus* estudadas nesse trabalho (MpCHIT1 e MpCHIT2), parece que *S. cerevisiae* não tem outro homólogo em *M. perniciosus* (Tabela 1). FKS1 faz parte do complexo glucano sintase que é responsável pela biossíntese de glucano, maior componente da parede celular em fungos (LIU; BALASUBRAMANIAN, 2001; ONISHI et al., 2000; QADOTA, 1996).

O processo de transporte por vesículas foi identificado em dois clusters, nos quais as proteínas ATG8 (FIG. 3-F) e GDI1 (FIG. 3-D) estão presentes. Ainda ATG8 e o cluster no qual ela foi encontrada, estão relacionados com autofagia e resposta a escassez de nutrientes.

Processos relacionados com o ciclo celular, também foram identificados (FIG. 3-F), nos quais a proteína CKS1, que é uma *cyclin-dependent protein kinase*, responsável por processos de proteólise na fase M do ciclo celular (FIG. 2). Ainda, outro cluster (FIG. 3-H), incluiu a proteína SSZ1 que é uma HSP70 elemento do *ribosome-associated complex* (RAC), envolvida no processo de dobramento de proteínas (FIG. 2).

Assim, a FIG. 4-B mostra a centralidade (C, H, B e HB) de todos os genes presentes na Tabela 2, sendo ATG8, GDI1, TOR1, RHO1, CKS1, CDC42, KFS1 e ROM2 hub-gargalos; CDC10 e SSZ1 hubs; CTS1, KOG1, BAG7, AVO1, e CHS2 comuns. Dentre esses genes nenhum foi classificado apenas como gargalo.

2. Funções, expressão genica e avaliação de resposta de *M. perniciosus* ao estresse

De acordo com os resultados observados na análise de dissociação foi confirmado a existência de amplicons com tamanho esperado para cada gene alvo, independentemente da fase de desenvolvimento do fungo (Material suplementar 5). A análise de agrupamento possibilitou distinguir três perfis de expressão correspondendo a três agrupamentos (FIG4-B). Esses clusters, associados aos processos biológicos, módulos e centralidade dos homólogos observados para os homólogos em *S. cerevisiae* na rede (FIG. 3), possibilitaram identificar

padrões relevantes para compreender os principais fenômenos relacionados com autofagia e metabolismo de quitina.

O primeiro agrupamento foi caracterizado por reunir os genes Tor1, Kog1, Ggi1, Atg8 e Cts2 (FIG. 4-B). Esses genes estão relacionados com processos de reciclagem de nutrientes através de vias de autofagia, transporte através de vesícula, dentre outros processos como a organização da parede celular, catabolismo de quitina, crescimento (FIG. 3) e regulação de crescimento (FIG. 5). Esses genes apresentam perfil de expressão semelhante entre as diferentes fases de desenvolvimento analisadas, do *M. pernicioso*. Na fase do primórdio, eles têm níveis de expressão acima da média. Antes (fase rosa) e durante o estresse (fase rosa escuro), esses genes apresentam os níveis de expressão abaixo da média (FIG. 4-B).

Os genes Chs2, Rom2, Fks1, Avo1 e Cdc42, se destacam por estarem envolvidos com processos de síntese de glucano, divisão celular, manutenção da parede celular, sinalização e de modo geral, apresentam perfil de expressão abaixo da média na fase branca e primórdio, o que sugere que nessas fases os processos de divisão celular síntese de parede podem não ser tão intensos. No momento do estresse dentre os genes estudados, se destacam: Bag7, Ssz1, que apresentam níveis de expressão acima da média e têm desvios abaixo da média após o estresse, na fase do primórdio; juntos eles compõem um terceiro *cluster* (FIG. 4-B). Nesse grupo, Chs2 e Rom2 apresentaram correlação positiva altamente significativa e no momento do estresse são os genes que apresentam maiores valores de desvios acima da média.

Os genes Cts1, Rho1, Cdc10 e Cks1 fazem parte de um segundo agrupamento (FIG. 4-B) que tem níveis de expressão acima da média apenas das fases iniciais (branca e amarela), distanciando seus níveis de expressão para baixo da média, nas fases rosa escuro e primórdio.

DISCUSSÃO

1. Considerações

Aqui, com base nos resultados obtidos, destacamos três importantes considerações, para sistematizarmos as principais discussões desse trabalho: i. os genes aqui selecionados e estudados estão envolvidos com o balanço entre crescimento micelial para a proliferação de hifas, sinalizando e atuando diretamente para a produção de compostos da parede celular; ii. consideramos a fase rosa escuro como uma resposta mais imediata ao estresse, onde ocorre intensificação da síntese de biomoléculas, como quitina e glucano, que serão recicladas em tempos tardios, que aqui consideramos ser a fase de desenvolvimento do primórdio. iii. Genes como RHO1 regula negativamente TORC1, que está no topo da regulação de processos de autofagia que é determinante para a produção inicial da estrutura reprodutora em *M. perniciosa*; esse processo depende de TORC1 e GTPases como ROM2 e RHO1, enquanto TORC2 parece responder ao estresse tem maior relação com a proliferação de hifas.

2. Sinalização celular, resposta a estresse e desenvolvimento de *M. perniciosa*

2.1 GTPases monoméricas importantes na resposta ao estresse e formação de estruturas reprodutoras

Dentre as *GTP-Binding protein* (GTP-Bp) temos importantes componentes da via das GTPases monoméricas, que estão relacionadas com diversos processos celulares como morfogênese, polaridade, divisão celular, dentre outros (JAFPE; HALL, 2005). Dentro desse grupo destacamos duas importantes proteínas da subfamília **RasHO**mológo (Rho): **C**ell **D**ivision **C**ycle 42 (CDC42) (JAFPE; HALL, 2005; SUDBERY, 2008) e RHO1. Os impactos da atuação de RHO1 na célula, estão relacionados com sua capacidade de regular vias como a MAPK pela ativação da **P**rotein **K**inase **C** (PKC1), que é um regulador central dessa via (FIG. 5). MAPK regula processos como a proliferação celular, diferenciação, apoptose, resposta a estresse e inclusive fatores de transcrição, como SKN7 e RIM1 que estão relacionados com o

controle da expressão de genes envolvidos na organização da parede celular (FIG. 3-E, FIG. 5) (FUCHS; MYLONAKIS, 2009a; LEVIN, 2011; NONAKA et al., 1995; PLOTNIKOV et al., 2011). Em *M. pernicioso*, Rho1 apresentou níveis de expressão abaixo da média após o estresse, sugerindo que esse gene pode ter mais relevância nos tempos iniciais do desenvolvimento do fungo (FIG. 4-B). Seus maiores níveis de expressão ocorrem na fase amarela, sugerindo que esse gene pode ser mais relevante durante o desenvolvimento antes do estresse. Embora não tenhamos estudado elementos da via MAPK, destacamos essa via como fundamental para as respostas *downstream* de RHO1 (FIG. 5) e consequente regulação da expressão de genes como Fks1 e outros genes responsáveis pela organização da parede celular (DRGONOVÁ et al., 1996; GUARRO; PIETRO, 2008; LEVIN, 2011). RHO1 atua tanto na regulação da expressão genética de FKS1, como na regulação direta do complexo glucano sintase. A correlação entre MpRho1 e MpFks1 não foi significativa. Por outro lado, Rom2 que é um regulador *upstream* de Fks1 e têm correlação positiva significativa entre si (FIG. 4-A). Essa é uma relação que vale ser melhor explorada em estudos posteriores para melhor compreender a dinâmica da síntese de glucano durante o desenvolvimento de *M. pernicioso* durante, visto que ROM2 é uma proteína gargalo e pode ser determinante no processo de síntese de glucano por sua relação com FKS1 (FIG. 4-A).

RHO1 possui em sua estrutura uma molécula de Guanina Difosfato (GDP) que precisa ser trocada para uma Guanina Trifosfato (GTP) para exercer sua função. Essa troca depende da atuação de proteínas Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF) (MADDEN; SNYDER, 1998; OZAKI et al., 1996). ROM2 é bem conhecida como GEF para RHO1 (FIG. 5). Esses dois genes são hub-bottleneck (FIG-3-E), assim, podemos considera-los fundamentais para o equilíbrio do desenvolvimento de *M. pernicioso* por regular múltiplos processos (YU et al., 2007). A regulação de RHO1, por ROM2 é uma interação que merece destaque. Embora a correlação entre ROM2 e RHO1 em *M. pernicioso*, não tenha sido significativa (FIG. 4-A),

devemos considerar a relevância de RHO1 para o controle de vias como MAPK, TORC1 e FKS1 na síntese de glucano (DAVID, 2012; FUCHS; MYLONAKIS, 2009a; LEVIN, 2011; PLOTNIKOV et al., 2011; YAN; LAI; JIANG, 2012). Outra função de ROM2, está associada com a progressão do ciclo celular (FIG. 3) em resposta a sinais de escassez de nutrientes. Nessas condições, TORC2 atua no fenômeno de polarização celular através da ativação de ROM2 que ativa RHO1 e as subseqüentes respostas via MAPK (FIG. 5) (BOYCE; A., 2006). Os maiores valores de expressão de *MpRom2*, se dá logo após o estresse (rosa escuro) (FIG. 4-B). Nessa mesma condição, *MpAvo1* (representante do complexo TORC2) também apresenta maior nível de expressão quando comparado com as demais fases. Ainda, *MpRom2* e *MpAvo1*, apresentam correlação positiva significantes, indicando que em *M. perniciosus* esses dois genes podem atuar juntos no controle do crescimento.

MpRom2 tem correlação positiva com *MpChs* (FIG. 4-A) e ambos alcançam seus maiores níveis de expressão na fase rosa escuro. Isso nos dá indícios de que nessa condição o fungo ainda investe em processos biossintéticos, como na produção dos componentes da parede celular (FIG. 3-E). A síntese de componentes da parede celular (quitina e glucano) é regulada via ROM2 (FIG. 5), logo, essa correlação é coerente com o que mostra a literatura (BICKLE et al., 1998; CARDON et al., 2012). Pires e colaboradores (2009), identificaram e analisaram a expressão de uma RHO1-GEF durante o desenvolvimento de *M. perniciosus*, e consideraram que esse é um dos genes importantes na resposta a escassez de nutrientes, e essa resposta precede à formação do primórdio. A síntese de compostos como quitina será fundamental em processos como a formação de estruturas reprodutoras, através de processos de reciclagem de nutrientes (BOYCE; A., 2006).

Também, relacionada com RHO1, encontramos BAG7 (FIG. 3, FIG. 5) que embora não seja considerada central (FIG. 3-E), é importante por regular negativamente a atividade de RHO1. BAG7 está relacionada com a organização do citoesqueleto de actina e controle da

síntese da parede celular (FIG. 5) (LOCKSHON et al., 2012; SCHMIDT; SCHMELZLE; HALL, 2002). Devido aos seus baixos valores para as centralidades *degree* e *betweenness*, BAG7 pode ser considerado um alvo com pouca importância para o sistema, porém importante, por regular a expressão RHO1.

Outra GTPase que se destaca junto com RHO1 é CDC42. Ela está associada com o fenômeno de polarização celular, sendo considerado um regulador mestre desse processo (PEREZ; RINCÓN, 2010; TAPON; HALL, 1997). A literatura tem mostrado que CDC42 age na formação de septos e crescimento filamentosos, e que em *Schizophyllum commune* está relacionada com *mating-type*, indicando a relevância desse gene no processo de dicarionização que é necessário para posterior processo de reprodução; além disso é determinante para a morfologia de hifas (WEBER et al., 2005). O processo de formação do primórdio é marcado pelo processo de ramificação e fusão de hifas (anastomose) (PIRES et al., 2009) e CDC42 pode ser determinante para esses fenômenos, visto que mutantes de CDC42 demonstram redução no crescimento das ramificações (KOKKELINK et al., 2011). A expressão de MpCdc42, em *M. perniciosus*, apresenta níveis de expressão acima da média até a fase rosa escuro (FIG. 4-B); esse estágio é caracterizado por possuir hifas no estado de anastomose (PIRES et al., 2009).

2.1.1. Organização e manutenção da integridade da parede celular

Os fungos possuem uma parede celular que é essencial para a viabilidade de suas células, em processos de morfogênese, desenvolvimento filamentosos, patogenicidade, dentre outros (LEVIN, 2011). A síntese e manutenção dessa estrutura é feita por proteínas associadas à de sinalização Cell Wall Integrity (CWI). Essas proteínas são responsáveis por sinalizar para a síntese dos constituintes da parede celular, principalmente, glucano e quitina, além de mediar a resposta e reparo a danos na parede. Em *S. cerevisiae* essa via é muito bem estudada e possui receptores que percebem a condição de estresse (WCS1, WCS2, WCS3, MID1 e MTL1) e

transmitem o sinal para RHO1 GTPase, através do GEF ROM2/1. RHO1 desencadeia uma série de sinais na célula que vão desde a ativação de proteínas via fosforilação até a ativação da expressão de genes relacionados à síntese dos compostos da parede celular, via ativação de fatores de transcrição, como SKN7, RIM1e SWI1/2 (FIG. 5) (LEVIN, 2011; FUCHS; MYLONAKIS, 2009; GARCÍA et al., 2017). Essa ativação é feita via MAPK.

A estrutura da parede celular de fungos é muito complexa e cada fungo possui uma parede celular muito peculiar em relação a seus padrões moleculares, porém existe uma composição básica que é comum a todos eles. As principais moléculas encontradas na parede celular dos fungos são: quitina, glucano, glicoproteínas e manano (BOWMAN; FREE, 2006). Embora a quitina seja um carboidrato importante para os fungos, ela representa apenas 1-3 % do peso seco da parede celular de fungos como leveduras, sendo que 5% desse valor corresponde à forma desacetilada da quitina (quitosano) (BOWMAN; FREE, 2006; DÍAZ-JIMÉNEZ et al., 2012). Em resposta a estresses, os níveis de quitina na parede celular pode aumentar muito, podendo chegar a 20% do seu peso seco. Essa resposta rápida na síntese de quitina está relacionada com o fato de existir uma reserva de sintase de quitina 3 (CHS3) na face *trans* do complexo de Golgi. Na condição de estresse, CHS3 é transportada para a membrana plasmática, onde ela desempenhará seu papel na síntese de quitina (LEVIN, 2011; VALDIVIESO et al., 2000). Embora em *S. cerevisiae* EU154354.1 de *M. perniciosa* seja mais similar para uma CHS2, em *U. maydis*, ele foi considerado homólogo a uma CHS3 (UM00474.1) (Tabela 1). Gomes e colaboradores (2016) relatou a expressão de EU154354.1 (MpChs) e os dados utilizados aqui, para esse gene foi o mesmo. Quando comparamos a expressão de ROM2, que está no topo da via CWI, com MpChs, constatamos que eles apresentam correlação positiva significativa, reforçando assim a relação da importância desses dois genes para a resposta ao estresse (FIG. 4-A, FIG. 4-B), principalmente, pelo fato deles apresentarem um pico de expressão na fase rosa escuro (FIG. 4-B).

Enquanto a quitina é um dos menores constituintes da parede celular, o glucano é o maior, chegando a variar entre 50-60% do peso seco da parede celular. O glucano é um carboidrato de cadeia linear, formado a partir de moléculas de UDP-glicose ligadas através de ligações β -1,3- (30-45% da parede), com ramificações β -1,6 (5-10% da parede) (KLIS; BOORSMA; DE GROOT, 2006; LEVIN, 2011). A síntese de glucano é realizada por proteínas intermembranares que compõem o complexo Glucano Sintase (GS), FKS1, FKS2 e FKS3 (de sensível a FK506) (KLIS; BOORSMA; DE GROOT, 2006). Aqui, foi observada uma homologia entre ABRE01013085.1 de *M. pernicioso* (MpFks1) e uma glucano sintase, tanto em *U. maydis* (UM01639.1) (FONSECA-GARCÍA; LEÓN-RAMÍREZ; RUIZ-HERRERA, 2012) como em *S. cerevisiae* (ScFKS1) (Tabela 1). MpFks1 se agrupa com genes relacionados com a resposta ao estresse (MpSsz1, MpAvo1) e a organização da parede celular (MpChs, MpRom2) (FIG. 3-E e FIG. 4-B, respectivamente). Ao observarmos a correlação entre MpFks1, MpAvo1 e MpRom2 (FIG. 4-A), chamamos atenção para a via que começa com TORC2, que ativa ROM2, que por sua vez desencadeará a via CWI (FIG. 5), tendo no final, a expressão de genes como Fks1 e Chs. A fase rosa escuro de *M. pernicioso* cultivado em bolachas, se destaca por ser o momento até onde esses genes se mantêm com níveis de expressão acima da média, sugerindo que existe uma participação ativa desses genes, para a resposta ao estresse (FIG. 5) e são importantes até essa fase. O acúmulo de MpFks1 na fase do primórdio é muito abaixo da média, sugerindo mais uma vez que na fase do primórdio *M. pernicioso* não investe em processos biossintéticos, como a formação de glucano.

A literatura mostra que ROM2 e RHO1 são muito importantes para uma série de processos biológicos, em fungos. Essa importância é revelada através análise de centralidade (FIG. 3) que mostra que essas proteínas são hub-bottleneck. Embora possamos considera-los como alvos para o controle de *M. pernicioso*, quando levamos em consideração a conservação entre muitas espécies, poderíamos afetar espécies não alvos. Por outro lado FKS1 vem sendo

utilizado como um eficiente alvo para o controle do desenvolvimento em fungos (KITAMURA et al., 2009; KURTZ; REX, 2001).

Os processos relacionados com a síntese de parede celular são importantes não apenas para a manutenção dessa estrutura e bom funcionamento da célula, mas também, para o crescimento filamentoso em fungos. A plasticidade e dinâmica da parede celular durante o crescimento e a morfogênese exige a atividade de enzimas que atuem no balanço entre síntese (quitina e glucano sintase) e degradação (glucanases e quitinases) da parede, de modo programado. Durante esses processos, as células do fungo tendem a degradar regiões de sua parede para permitir o afrouxamento necessário para que o organismo cresça (LEVIN, 2011). Por outro lado, existe a degradação programada, quando o fungo está em condições de estresse, através de processos de autólise (SHIN et al., 2009). Gomes e colaboradores (2016) identificaram duas importantes quitinases em *M. perniciosus*. Eles constataram que ABRE01009813.1 (*MpChit2*) aumenta seus níveis de expressão durante a formação do primórdio, enquanto ABRE01017587.1 (*MpChit1*), parece não contribuir muito, nem na resposta ao estresse, nem na formação do corpo de frutificação (FIG. 4-B). Considerando a expressão de *MpChit1* e *MpChit2* encontrada por Gomes e colaboradores (2016), *MpChit2* não se correlaciona positivamente com nenhum dos genes relacionados sinalização e síntese da parede celular (*Fks1*, *Chs*, *Rho1*, *Rom2*), enquanto *MpChit1*, sim. Por outro lado, *MpChit2* se agrupa com *MpTor1*, *MpKog1*, *MpAtg8* e *MpGdi1* que estão relacionados, principalmente, com transporte de vesículas e autofagia (FIG. 3 e FIG. 5). Os níveis de expressão desses genes se destacam na fase do primórdio (GOMES et al., 2016). Essas observações suportam a ideia de que a expressão de *MpChit2* está relacionado com processos de reciclagem, auxiliando *M. perniciosus* na obtenção de nutrientes para o desenvolvimento do corpo de frutificação, enquanto *MpChit1*, tende a se relacionar com processos biossintéticos em condições de desenvolvimento normais do fungo. Embora algumas quitinases não tenham sido demonstradas como essenciais

para a sobrevivência em *S. cerevisiae*, a deleção desse gene nesse fungo interfere na formação de septos (DÜNKLER; JORDE; WENDLAND, 2008). Em *S. cerevisiae*, tanto MpChit1, como MpChit2 tem maior similaridade com CTS2 (quitinase 2) indicando que CTS2 é o único homólogo entre *S. cerevisiae* e *M. perniciosus*. CTS2 parece não ser uma proteína importante para o sistema quando consideramos sua centralidade. Por outro lado, em *M. perniciosus* MpChit2, pode ser um alvo que pode interferir na formação do primórdio por estar muito correlacionada com MpAtg8, MpTor1 e MpKog1, que são centrais para o sistema e relacionados com processos de reciclagem de nutrientes e provavelmente são determinantes para a formação da estrutura reprodutora (FIG. 3, FIG. 4-B).

2.2. Via de sinalização TOR

A sinalização celular via **T**arget **O**f **R**apamycin (TOR) é a principal via de resposta às variações nos teores de nutrientes na célula. Essa via é muito conservada em eucariontes e tem como principais elementos os complexos TOR (TORC1 e TORC2) (ABRAHAM, 2004). Em *S. cerevisiae* os dois complexos estão presentes (LOEWITH; HALL, 2011). Em basidiomicetos, como *Pleurotus ostreatus*, tem sido relatados os dois complexos, sendo que TORC1 é composto por três subunidades (TOR1, KOG1 e LST8), das quais TOR2 pode ser substituído por TOR1 (LOEWITH; HALL, 2011; WULLSCHLEGER et al., 2005). Por outro lado TORC2 apresenta as subunidades AVO1, AVO3, LST8 e TOR2 que são conservadas em eucariotos (FIG. 5) (LOEWITH; HALL, 2011; SCHMELZLE; HALL, 2000; SHERTZ et al., 2010; WULLSCHLEGER et al., 2005). Em TORC2, TOR1 não está presente. Em *M. perniciosus*, identificamos KOG1, TOR1 e AVO1 (Tabela1, Tabela 2), mostrando que esse fungo possui ambos complexos.

TOR1 é um hub-gargalo que pode ser considerado um grande conector entre dos processos de organização da parede celular, crescimento celular, controle da biogênese de

ribossomos e resposta a estresse (Tabela 2 e FIG. 3-A). O papel dessa proteína se destaca, quando comparamos com os demais componentes do complexo TORC1, que não apresentam alta centralidade. TORC1 tem sido relatado na literatura, como sensível ao inibidor de proliferação celular, rapamicina e escassez de nutrientes, estando intimamente relacionado com a regulação do crescimento e resposta a escassez de nutrientes (FUCHS; MYLONAKIS, 2009a). A percepção da condição de escassez de nutrientes via TORC1 se dá através da sua subunidade KOG1. Nessa condição o complexo tem sua atividade bloqueada através do domínio RAPTOR_N de KOG1 (LOEWITH; HALL, 2011) (Tabela 2, FIG. 5). Esse domínio foi encontrado em ABRE01015241.1 (Tabela 2). Quando analisamos os valores de expressão de *MpKOG1* e *MpTOR1* percebemos que esses genes têm níveis de acúmulo acima da média, na fase do primórdio (FIG. 4-B), na qual a condição de estresse está totalmente estabelecida e o fungo tende a não ter outro meio de suprimento de nutrientes, que não os processos de reciclagem de suas estruturas (GOMES et al., 2016; PIRES et al., 2009; PUNGARTNIK et al., 2009a).

Aqui, mais uma vez destacamos a importância da GTPase RHO1. Essa proteína tem a capacidade de interagir com o domínio RAPTOR da proteína KOG1 (FIG. 5) (DAVID, 2012; YAN; LAI; JIANG, 2012). Essa interação é marcante para a regulação *downstream* do complexo TORC1, por inativar esse complexo, via interação RHO1-KOG1 (DAVID, 2012; YAN; LAI; JIANG, 2012). Ao observamos o perfil de expressão de RHO1 na fase do estresse (Rosa escuro) e primórdio (FIG. 4-B), observamos que *MpRho1* apresenta níveis de expressão abaixo da média. Os valores mais reduzidos de expressão de *MpRho1*, na fase do primórdio, pode ser um fator determinante para a função de TORC1, visto que a presença dessa GTPase pode inibir a atividade desse complexo. A interação entre TORC1 e RHO1, através de KOG1, tem sido destacada como marcante para o equilíbrio entre expansão espacial e crescimento em *S. cerevisiae* (YAN; LAI; JIANG, 2012). Desse modo, chamamos a atenção para os níveis de

expressão dos componentes de *TORC1* (KOG1 e TOR1) apresentam níveis de expressão abaixo da média, permitindo inferir que nesse momento, o fungo não investe em crescimento, ao passo que isso tende a acontecer na formação do corpo de frutificação (primórdio) (FIG. 4-B). Porém, nessa fase, a reciclagem de nutrientes via processos autofágico é a fonte de biomoléculas para a construção do corpo do primórdio. Nesse ponto, o aumento da expressão de *MpATG8*, *MpTOR1* e *MpKOG1*, associada a redução da expressão de *MpRho1*, pode ser determinante para o êxito desse fenômeno. Nesse sentido, enquanto TOR é o ator direto do mecanismo de sinalização, KOG1, é o elemento regulador desse ator. Muito se conhece a respeito dos complexos TORC1, em *S. cerevisiae*, porém, a literatura aborda pouco a respeito da contribuição desses complexos durante o desenvolvimento de basidiomicetos. Nós sugerimos que TORC1 é mais relevante para a formação do primórdio, sinalizando para processos de controle do crescimento (FIG. 3-A)

Por outro lado o segundo complexo TOR (TORC2) tem sido relatado em *S. cerevisiae* como não é sensível a rapamicina e está relacionado com processos de controle da polimerização da actina (que é uma função exclusiva para esse complexo) e manutenção da integridade da parede celular (FIG. 5) (LOEWITH et al., 2002). Uma pergunta importante nesse contexto é: TORC2 também não responde à escassez de nutrientes? A literatura aponta que sim, porém, esse complexo não possui a subunidade KOG1, que é um importante receptor de sinal para escassez de nutrientes (DAVID, 2012; YAN; LAI; JIANG, 2012). A não sensibilidade desse complexo à rapamicina é explicada pela presença da subunidade AVO1 em TORC2, que tem sido relatada como responsável por impede a ligação do receptor da rapamicina (FKBP-rapamycin binding) na região do domínio FRB em TOR2. Sendo assim, AVO1 é um importante representante do complexo TORC2, pois sua presença na célula garantir que TOR2 não responderá à escassez de nutrientes (LOEWITH; HALL, 2011).

Os resultados da expressão genica tem indicado que *MpAvo1* (complexo TORC2) se correlaciona bem com genes que aqui estamos considerando como envolvidos com desenvolvimento normal e reparo por resposta ao estresse (*MpFks1*, *MpChit1*, *MpRom2* e *MpChs*) (FIG. 4-A). Enquanto TORC1 tem maior relação com a fase do primórdio, TORC2, parece ser mais relevante para as respostas desencadeadas até o momento do estresse. Ao interagir com ROM2, TORC2 ativa a via CWI (FIG. 5), que pode induzir processos relacionados com crescimento, polimerização de actina, dentre outros processos que são marcantes do desenvolvimento filamentado (SCHMELZLE; HALL, 2000). Assim, associamos o papel de TORC2 com a resposta mais imediata ao estresse, enquanto *M. pernicios*a ainda possui nutrientes disponíveis TORC2 e tenderá a aumentar a síntese de biomoléculas para se preparar para a falta deles (FIG. 4-A e B, FIG. 5). Em seguida na fase do primórdio, que é uma condição de extrema falta de nutrientes. Nessa fase o tapete de micélio é capaz de produzir o basidioma mesmo em superfícies não nutritivas (GRIFFITH; HEDGER, 1993; PURDY; DICKSTEIN, 1990; PURDY; SCHMIDT, 1996), assim, a expressão de TORC2 reduz e dá lugar ao complexo TORC2 e genes associados com reciclagem de nutrientes (FIG. 4-B).

3. Transporte através de vesículas, autofagia e desenvolvimento em *M. pernicios*a

Enquanto o proteassoma é uma via secundária para degradação de proteínas, a macroautofagia (autofagia) é um processo primário para o catabolismo celular (LEVINE et al., 2004). Esse mecanismo é um fenômeno celular programado essencial para o remodelamento das estruturas celulares, e é responsável pelo balanço dos recursos quando o organismo está sob condição de escassez de nutrientes. Portanto ele é um processo essencial para o crescimento de organismos como os fungos. Através desse mecanismo a célula consegue reciclar suas organelas; macromoléculas não funcionais, como proteínas, dentre outras. Existem basicamente três tipos de processos autofágicos: a microautofagia, macroautofagia e autofagia mediada por

Chaperonas (AMC) (GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010; KELEKAR, 2005). Aqui, a macroautofagia, ganha destaque como um fenômeno muito relevante e ATG8 é considerado um marcador para autofagia. No processo de microautofagia, o conteúdo a ser digerido se funde direto ao lisossomo (FIG.5). A AMC é um processo relacionado a reciclagem de proteínas, no interior da célula. Por outro lado, a macroautofagia, vesículas (autofagossomo) contendo os elementos a serem digeridos, se funde com lisossomos. O resultado dessa fusão gera uma estrutura denominada autolisossomo. A literatura tem atribuído o nome “autofagia” para descrever a macroautofagia. Esse processo é desencadeado em resposta a escassez de nutrientes, como a depleção de nitrogênio e íons como zinco, manganês, ferro, etc. (POLLACK; HARRIS; MARTEN, 2009).

O processo de autofagia é orquestrado por uma série de *Autophagy Related Genes* (ATG). Dentre as vias relacionadas com a regulação dos processos de autofagia, TORC1 é de longe a mais relevante quando tratamos da percepção a escassez de nutrientes e regulador *downstream* do processo de autofagia. ATG8 é um importante gene, relacionado com a formação inicial de vesículas para os processos autofágicos. Esse gene é considerado um marcador para autofagia, diferenciação e desenvolvimento em diversos grupos de eucariontes, nas mais diversas condições, incluindo na resposta ao estresse (KLIONSKY, 2007; LEVINE et al., 2004; SCHMELZLE; HALL, 2000). Assim, entendemos que genes que se correlacionam bem com Atg8, tendem a estar envolvidos com esses processos. O processo de autofagia é regulado negativamente, por TOR através de hiperfosforilação de ATG13 que perde sua afinidade por ATG1 e terminada por bloquear os subsequentes processos na autofagia (FIG. 5) (LEVINE et al., 2004; LOEWITH; HALL, 2011; POLLACK; HARRIS; MARTEN, 2009; SHOJI; KIKUMA; KITAMOTO, 2014).

Em basidiomicetos, essas mudanças tendem a levar o fungo a produzir suas estruturas reprodutoras, através do seu basidiocarpo (GOMES et al., 2016; PIRES et al., 2009;

POLLACK; HARRIS; MARTEN, 2009; SANTOS; BRENDDEL; PUNGARTNIK, 2008). De acordo com o perfil de expressão de genes como *ATG8*, *TOR1*, *KOG1* e *CHIT2*, que estão voltados para a resposta ao estresse e relacionados com autólise e autofagia, podemos inferir que em *M. pernicioso* a resposta imediata ao estresse não é o remodelamento de hifas; esse processo se instalará com o prolongamento do estresse (na fase do promórdio) (FIG. 4-B) (GOMES et al., 2016).

ATG8 e GDI1 foram encontradas em módulos diferentes, porém foram anotadas em processos biológicos de transporte vesicular (FIG. 3-D e FIG.3-F). Embora a correlação desses genes não tenha sido significativa, elas apresentam um perfil de expressão muito semelhante durante as fases de desenvolvimento de *M. pernicioso* (Fig. 4). ATG8 é uma proteína clássica, bem caracterizada na literatura como relevante na formação do vacúolo do processo de macroautofagia (FIG. 5) (NAIR et al., 2011; POLLACK; HARRIS; MARTEN, 2009). A proteína GDI1 tem sido relatada na literatura como um importante componente regulatório de *S. cerevisiae* e que, igualmente a ATG8, após o estresse retorna a aumentar seus níveis de expressão

CONCLUSÃO

O uso de *S. cerevisiae* como modelo foi determinante no estudo das funções celulares dos genes selecionados. Embora esse modelo seja unicelular, o estudo dos processos celulares possibilitaram compreender o impacto de genes importantes para fenômenos de autofagia, desenvolvimento e resposta a estresse, reciclagem de nutrientes, sinalização e organização da parede celular no remodelamento de hifas através. A formação do corpo de frutificação em *M. perniciosus* é consequência do estresse e isso se dá por meio da regulação de fenômenos como a síntese da parede celular e regulação do crescimento. Para isso, genes da via TOR (TORC1 e TORC2) parecem cooperar de maneira diferente, sendo que TORC1 parece ser mais relevante para formação do basidiocarpo, e TORC2, na percepção e respostas no momento do estresse e sinalização para vias como das GTPases, aqui representadas por MpROM2, MpRHO1 e MpCDC42. Os estudos de rede reforçam a importância dessas proteínas como hubs-gargalos, sugerindo que o desenvolvimento de *M. perniciosus* pode ser severamente comprometido, caso algum desses alvos seja bloqueado. Por outro lado, por se tratar de vias muito conservadas entre diferentes espécies, sua manipulação deve ser realizada com muita cautela, afim de evitar graves desequilíbrios ecológicos, por agir sobre espécies não alvo e até mesmo no ser humano.

REFERENCIAS

ABBASI, A.; HOSSAIN, L.; LEYDESDORFF, L. Betweenness centrality as a driver of preferential attachment in the evolution of research collaboration networks. **Journal of Informetrics**, v. 6, n. 3, p. 403–412, 2012a.

ABBASI, A.; HOSSAIN, L.; LEYDESDORFF, L. Betweenness centrality as a driver of preferential attachment in the evolution of research collaboration networks. **Journal of Informetrics**, v. 6, n. 3, p. 403–412, 2012b.

ADAMI, A. et al. Structure of TOR and Its Complex with KOG1. **Molecular Cell**, v. 27, n. 3, p. 509–516, 2007.

AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v.

97, n. 5, p. 1012–1022, 1 set. 2005.

ALBERT, R.; JEONG, H.; BARABÁSI, A.-L. Error and attack tolerance of complex networks. **Nature**, v. 406, n. 6794, p. 378–382, 27 jul. 2000.

ARGÔLO SANTOS CARVALHO, H. et al. Polygalacturonases from *Moniliophthora perniciosa* are regulated by fermentable carbon sources and possible post-translational modifications. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 60, p. 110–21, nov. 2013.

BADER, G. D.; HOGUE, C. W. V. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. **BMC Bioinformatics**, v. 4, n. 1, p. 2, 2003.

BARABÁSI, A.-L. Network science: the Barabási-albert model. **Network Science**, 2015.

BARABÁSI, A.-L. The Scale-Free Property. **Network Science**, p. 474 pages, 2016.

BARABÁSI, A.-L.; ALBERT, R. Emergence of Scaling in Random Networks. **Science**, v. 286, n. October, p. 509–512, 1999.

BARABASI, A. L.; OLTVAI, Z. N. Network Biology: Understanding the Cell's Functional Organization. **Nature Review**, v. 5, n. February, p. 101–113, 2004.

BASTOS, C N; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology**, n. 1981, p. 306–312, 1985.

BASTOS, C. N.; ANDEBRHAN, T. In vitro production of basidiospores of *Crinipellis perniciosa*, the causative agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, n. 3, p. 406–409, 1987.

BAVELAS, A. A Mathematical Model for Group Structures. **Human Organization**, v. 7, n. 3, p. 16–30, 1948.

BENJAMINI, Y. et al. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. **Behavioural brain research**, v. 125, n. 1–2, p. 279–84, 1 nov. 2001.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Source Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological) Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological) J. R. Statist. Soc. B**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 14 nov. 1995.

BICKLE, M. et al. Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. **EMBO Journal**, v. 17, n. 8, p. 2235–2245, 1998.

BÖLKER, M. *Ustilago maydis* - A valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. **Microbiology**, v. 147, n. 6, p. 1395–1401, 2001.

BONATTO, D.; NAKAYA, H. T. I. Genômica e biologia de sistemas. In: INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (Ed.). . **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações**. Cambridge: Cambridge University Press, 2016. v. 1p. 227–302.

BORGES, A. C. Total Lipid and Fatty Acid Accumulation During Basidiospore Formation in

the Ectomycorrhizal. n. 1, p. 1531–1540, 2008.

BORKOVICH, KATHERINE A. EBBOLE, D. J. Cellular and molecular biology of filamentous fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 157–158, jan. 2010a.

BORKOVICH, KATHERINE A. EBBOLE, D. J. Filamentous Fungi. **American Society for Microbiology Press**, v. 9, n. 2, p. 157–158, jan. 2010b.

BOTSTEIN, D.; CHERVITZ, S. A.; CHERRY, J. M. Yeast as a model organism. **Science (New York, N.Y.)**, v. 277, n. 5330, p. 1259–60, 29 ago. 1997.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, n. 8, p. 799–808, 2006.

BOYCE, K. J.; A., A. **Morphogenesis: Control of Cell Types and Shape**. [s.l.: s.n.].

BRANDES, U.; ERLEBACH, T. **Network Analysis: Methodological Foundations**. [s.l.: s.n.]. v. 3418

BREITLING, R. What is systems biology? **Frontiers in Physiology**, v. 1 MAY, n. May, p. 1–5, 2010.

BRUN, L. A.; CORFF, J. LE; MAILLET, J. Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species. **Environmental Pollution**, v. 122, p. 361–368, 2003.

BRYAN A. BAILEY LYNDEL W. MEINHARDT. **Cocoa Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters**. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 101

BUCHFINK, B.; XIE, C.; HUSON, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p. 59–60, 2014.

BUSHNELL, B. BBMap : A Fast , Accurate , Splice-Aware Aligner. **LBNL Department of Energy Joint Genome Institute**, p. 3–5, 2014.

CARDON, C. M. et al. PAS Kinase Promotes Cell Survival and Growth Through Activation of Rho1. **Science Signaling**, v. 5, n. 209, p. ra9-ra9, 2012.

CASCANTE, M. et al. Metabolic control analysis in drug discovery and disease. **Metabolic control analysis in drug discovery and disease.**, v. 20, n. 3, p. 243–249, 2002.

CHANG, Y. Y. et al. Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway. **Biochem Soc Trans**, v. 37, n. Pt 1, p. 232–236, 2009.

CHATR-ARYAMONTRI, A. et al. The BioGRID interaction database: 2017 update. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D369–D379, 2017.

CLAUSET, A.; NEWMAN, M. E. J.; MOORE, C. Finding community structure in very large networks. p. 1–6, 2004.

CONESA, A. et al. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674–3676, 2005.

CRUZ ET AL., 2011. Efecto del Azoxystrobin Sobre *Moniliophthora roreri*, Agente Causal de la Moniliasis del Cacao (*Theobroma cacao*). **REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA**, v. 31, p. 65–69, 2013.

CSÁRDI, G.; NEPUSZ, T. The igraph software package for complex network research. **InterJournal Complex Systems**, v. 1695, p. 1–9, 2006.

CUI, T. et al. Uncovering new signaling proteins and potential drug targets through the interactome analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 118, 2009.

DA HORA JUNIOR, B. T. et al. Transcriptomics and systems biology analysis in identification of specific pathways involved in cacao resistance and susceptibility to witches' broom disease. **Molecular bioSystems**, v. 8, n. 5, p. 1507–19, abr. 2012.

DAVID, R. Cell signalling: Rho1 keeps an eye on TORC1. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 5, p. 280–281, 2012.

DE ARRUDA, M. C. C. et al. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis pernicios* from different geographic origins and hosts. **Mycological research**, v. 107, n. Pt 1, p. 25–37, 2003.

DELGADO, J. C.; COOK, A. A. Nuclear condition of the basidia, basidiospores, and mycelium of *Marasmius pernicios*. **Canadian Journal of Botany**, v. 54, n. 1, p. 66–72, 1976.

DÍAZ-JIMÉNEZ, D. F. et al. Role of the fungal cell wall in pathogenesis and antifungal resistance. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 4, p. 275–282, 2012.

DRGONOVA, J. et al. Yeast Protein. v. 272, n. April, p. 1995–1997, 1996.

DRGONOVÁ, J. et al. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 272, n. 5259, p. 277–279, 1996.

DÜNKLER, A.; JORDE, S.; WENDLAND, J. An *Ashbya gossypii* *cts2* mutant deficient in a sporulation-specific chitinase can be complemented by *Candida albicans* CHT4. **Microbiological Research**, v. 163, n. 6, p. 701–710, 2008.

EL-AKHAL, M. R. et al. Proteomic analysis of conidia germination in *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology**, v. 195, n. 4, p. 227–246, 2013.

ENRIGHT, A. J. et al. Protein interaction maps for complete genomes based on gene fusion events. **Nature**, v. 402, n. 6757, p. 86–90, 1999.

EVANS, B. Y. H. C. Witches' broom disease of cocoa. p. 185–192, 1978.

EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicios*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, n. 3, p. 515–523, 1980.

FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database. **Nucleic acids research**, v. 36, n. Database issue, p. D281–8, jan. 2008.

FINN, R. D. et al. IPfam: A database of protein family and domain interactions found in the Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 364–373, 2014.

FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D279–D285, 2016.

FLÓREZ, A. F. et al. Protein network prediction and topological analysis in *Leishmania major* as a tool for drug target selection. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 484, 2010.

FONSECA-GARCÍA, C.; LEÓN-RAMÍREZ, C. G.; RUIZ-HERRERA, J. The regulation of different metabolic pathways through the Pal/Rim pathway in *Ustilago maydis*. **FEMS yeast research**, v. 12, n. 5, p. 547–56, ago. 2012.

FREEMAN, L. C. Centrality in Social Networks Conceptual Clarification. **Social Networks**, v. 1, n. 1968, p. 215–239, 1978.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. **Our paths might cross: The role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways** *Eukaryotic Cell*, 2009a.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Our paths might cross: The role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 11, p. 1616–1625, 2009b.

G. ALMEIDDA. Estudo da função biológica da Oxidase Alternativa (AOX) de *Moniliophthora perniciosa* (fungo da vassoura de bruxa) em *Saccharomyces cerevisiae*. 2014.

GARCÍA, R. et al. A novel connection between the Cell Wall Integrity and the PKA pathways regulates cell wall stress response in yeast. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5703, 2017.

GARZÓN, J. I. et al. A computational interactome and functional annotation for the human proteome. **eLife**, v. 5, n. OCTOBER2016, p. 1–27, 2016.

GAVIN, A.-C. et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 141–147, 2002.

GESTEIRA, A. S. et al. Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora perniciosa*. **Annals of botany**, v. 100, n. 1, p. 129–40, jul. 2007.

GLADFELTER, A. S. et al. Septin ring assembly involves cycles of GTP loading and hydrolysis by Cdc42p. **Journal of Cell Biology**, v. 156, n. 2, p. 315–326, 2002.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy : cellular and molecular mechanisms. **The Journal of Pathology**, v. 221, n. 1, p. 3–12, 2010.

GOMES, D. S. et al. Mycelial development preceding basidioma formation in *Moniliophthora perniciosa* is associated to chitin, sugar and nutrient metabolism alterations involving autophagy. **Fungal Genetics and Biology**, v. 86, p. 33–46, 2016.

GRIFFITH, G. W. et al. Witches' brooms and frosty pods: Two major pathogens of cacao. **New Zealand Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p. 423–435, 2003.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis perniciosus* using a bran-vermiculite medium. v. 99, p. 227–230, 1993.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis*. v. 72, n. August 1993, p. 278–289, 1994.

GU, Z.; EILS, R.; SCHLESNER, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics**, v. 32, n. 18, p. 2847–2849, 2016.

GUARRO, J.; PIETRO, A. DI. Rho1 has distinct functions in morphogenesis, cell wall biosynthesis and virulence of. v. 10, n. February, p. 1339–1351, 2008.

HARRINGTON, E. D.; JENSEN, L. J.; BORK, P. Predicting biological networks from genomic data. **FEBS Letters**, v. 582, n. 8, p. 1251–1258, 2008.

HE, F. et al. The prediction of protein-protein interaction networks in rice blast fungus. **BMC genomics**, v. 9, p. 519, 2008.

HEDGER, J. N.; PICKERING, V.; ARAGUNDI, J. Variability of populations of the witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosus*). **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, n. 4, p. 533–546, 1987.

HERMJAKOB, H. et al. IntAct: an open source molecular interaction database. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, n. Database issue, p. D452–5, 2004.

HO, Y. et al. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 180–183, 10 jan. 2002.

HUYNEN, M. A.; BORK, P. Measuring genome evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 11, p. 5849–5856, 1998.

IANIRI, G.; INDRUM, AL. Essential Gene Discovery in the Basidiomycete *Cryptococcus neoformans* for Antifungal Drug Target Prioritization. **mBio**, v. 6, n. 2, p. 1–18, 2015.

ISSERLIN, R.; EL-BADRAWI, R. A.; BADERY, G. D. The biomolecular interaction network database in PSI-MI 2.5. **Database**, v. 2011, n. May, p. 1–16, 2011.

ITO, T. et al. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 8, p. 4569–74, 2001.

JAFFE, A. B.; HALL, A. Rho GTPases: Biochemistry and Biology. p. 247–272, 2005.

JEONG, H. et al. The large scale organization of metabolic networks. **Nature**, v. 407, n. 6804, p. 651–654, 2000.

JEONG, H. et al. Lethality and centrality in protein networks. **Nature**, v. 411, n. 6833, p. 41–42, 2001.

JONES, A. M. et al. Border Control--A Membrane-Linked Interactome of *Arabidopsis*. **Science**, v. 344, n. 6185, p. 711–716, 2014.

KANEKO; ISHII, 2015. Effect of azoxystrobin on activities of antioxidant enzymes and alternative oxidase in wheat head blight pathogens... **J Gen Plant Pathol**, v. 75, n. January, p. 388–398, 2015.

KELEKAR, A. Autophagy. v. 271, p. 259–271, 2005.

KESHAHA PRASAD, T. S. et al. Human Protein Reference Database - 2009 update. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 767–772, 2009.

KHURI, S.; WUCHTY, S. Essentiality and centrality in protein interaction networks revisited. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2015.

KIM, J.-G. et al. Predicting the interactome of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* for target selection and DB service. **BMC bioinformatics**, v. 9, p. 41, 2008.

KITAMURA, A. et al. Discovery of a Small-Molecule Inhibitor of -1,6-Glucan Synthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 670–677, 1 fev. 2009.

KLIONSKY, D. J. Autophagy: From phenomenology to molecular understanding in less than a decade. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 11, p. 931–937, 2007.

KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 185–202, 2006.

KOKKELINK, L. et al. The small GTPase BcCdc42 affects nuclear division, germination and virulence of the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 11, p. 1012–1019, 2011.

KÜES; NAVARRO-GONZÁLEZ, 2010. Mating-type orthologous genes in the primarily homothallic *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of Witches' Broom Disease in cacao. **Journal of Basic Microbiology**, v. 50, p. 442–451, 2010.

KURTZ, M. B.; REX, J. H. Glucan synthase inhibitors as antifungal agents. **Advances in Protein Chemistry**, v. 56, p. 423–475, 2001.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, 2012.

LEE, I. et al. A single gene network accurately predicts phenotypic effects of gene perturbation in *Caenorhabditis elegans*. **Nature genetics**, v. 40, n. 2, p. 181–8, 2008.

LEVIN, D. E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. **Genetics**, v. 189, n. 4, p. 1145–1175, 2011.

LEVINE, B. et al. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. **Developmental cell**, v. 6, n. 4, p. 463–77, 2004.

LICATA, L. et al. MINT, the molecular interaction database: 2012 Update. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. 857–861, 2012.

LIN, M. et al. The Predicted Arabidopsis Interactome Resource and Network Topology-Based Systems Biology Analyses. **The Plant Cell**, v. 23, n. 3, p. 911–922, 2011.

LIU, J.; BALASUBRAMANIAN, M. K. 1,3-beta-Glucan synthase: a useful target for antifungal drugs. **Current drug targets. Infectious disorders**, v. 1, n. 2, p. 159–69, 2001.

LIU, S. et al. A computational interactome for prioritizing genes associated with complex agronomic traits in rice (*Oryza sativa*). **The Plant Journal**, v. 90, n. 1, p. 177–188, abr. 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

LOCKSHON, D. et al. Rho Signaling Participates in Membrane Fluidity Homeostasis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–10, 2012.

LOEWITH, R. et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. **Molecular Cell**, v. 10, n. 3, p. 457–468, 2002.

LOEWITH, R.; HALL, M. N. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. **Genetics**, v. 189, n. 4, p. 1177–1201, 2011.

MADDEN, K.; SNYDER, M. Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. p. 687–744, 1998.

MAERE, S.; HEYMANS, K.; KUIPER, M. BiNGO: A Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3448–3449, 2005.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D222–D226, 2015.

MARCOTTE, E. M. et al. Detecting Protein Function and Protein-Protein Interactions from Genome Sequences. **Science (New York, N.Y.)**, v. 285, n. 5428, p. 751–753, 2014.

MARELLI, J. et al. Infection Biology of *Moniliophthora perniciosa* on *Theobroma cacao* and Alternate Solanaceous Hosts. p. 149–160, 2009.

MARES, J. H. et al. Protein profile and protein interaction network of *Moniliophthora perniciosa* basidiospores. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 120, 2016a.

MARES, J. H. et al. Protein profile and protein interaction network of *Moniliophthora perniciosa* basidiospores. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 120, 2016b.

MARES, J. H. et al. Proteomic analysis during of spore germination of *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease in cacao. p. 1–10, 2017.

MATTHEWS, L. R. et al. Identification of Potential Interaction Networks Using Sequence-Based Searches for Conserved Protein-Protein Interactions or ' ' Interologs ' ' Identification of Potential Interaction Networks Using Sequence-Based Searches for Conserved Protein-Protein Inte. **Genome Research**, p. 2120–2126, 2001.

MCCANN, M. P.; SNETSELAAR, K. M. A genome-based analysis of amino acid metabolism in the biotrophic plant pathogen *Ustilago maydis*. **Fungal Genetics and Biology**,

v. 45, n. SUPPL. 1, p. 77–87, 2008.

MEINHARDT, L. W. et al. In Vitro Production of Biotrophic-Like Cultures of *Crinipellis pernicios*, the Causal Agent of Witches' Broom Disease of *Theobroma cacao*. v. 52, p. 191–196, 2006.

MEINHARDT, L. W. et al. *Moniliophthora pernicios*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: What's new from this old foe? **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 5, p. 577–588, 2008.

MELO, S. C. et al. Altered phenotypes in *saccharomyces cerevisiae* by heterologous expression of basidiomycete *moniliophthora pernicios* SOD2 gene. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 12324–12344, 2015.

MONDEGO ET AL., 2008. A genome survey of *Moniliophthora pernicios* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. **BMC Genomics**, v. 25, p. 1–25, 2008.

MORENO-HAGELSIEB, G.; LATIMER, K. Choosing BLAST options for better detection of orthologs as reciprocal best hits. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 24, n. 3, p. 319–24, 1 fev. 2008.

NAIR, U. et al. SNARE proteins are required for macroautophagy. **Cell**, v. 146, n. 2, p. 290–302, 2011.

NEIMAN, A. M. Ascospore Formation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 69, n. 4, p. 565–584, 2005.

NEWMAN, M. E. J. Fast algorithm for detecting community structure in networks. n. 2, p. 1–5, 2003.

NOIR, S. et al. A proteomic analysis of powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) conidiospores. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 2, p. 223–236, 2009.

NONAKA, H. et al. A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO journal**, v. 14, n. 23, p. 5931–5938, 1995.

OGATA, H. et al. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 1, p. 29–34, 1999.

OH, Y. T. et al. Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, n. 3, p. 246–253, 2010.

OLIVEIRA; LUZ, 2005. **Identificação e Manejo das Principais Doenças do Cacaueiro no Brasil**. [s.l: s.n.].

ONISHI, J. et al. Discovery of novel antifungal (1,3)-beta-D-glucan synthase inhibitors. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 368–377, 2000.

OZAKI, K. et al. Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO journal**, v. 15, n. 9, p.

2196–207, 1996.

P. ERDÖS, A. R. The Evolution of Random Graphs. **Transactions of the American Mathematical Society**, v. 286, n. 1, p. 257, 1984.

PARK, D. et al. Comparative interactomics analysis of protein family interaction networks using PSIMAP (protein structural interactome map). **Bioinformatics**, v. 21, n. 15, p. 3234–3240, 2005.

PEARSON, W. R. An introduction to sequence similarity (“homology”) searching. **Current Protocols in Bioinformatics**, n. SUPPL.42, p. 1–8, 2013.

PEREZ, P.; RINCÓN, S. A. Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. **Biochemical Journal**, v. 426, n. 3, p. 243–253, 2010.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e–45, 2001.

PHIZICKY, E. M.; FIELDS, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 94–123, 1995.

PICKERI; HEDGER, 1987. PRODUCTION OF BASIDIOCARPS OF THE COCOA PATHOGEN CRINIPPELLIS PERNICIOSA IN IN VITRO CULTURE. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 25, p. 2–4, 1987.

PINTO, L. R. M.; PIRES, J. L. Seleção de plantas de cacau resistentes à vassoura-de-bruxa. p. 35 p (Boletim Técnico No 181), 1998.

PIRES, A. B. L. et al. Early development of *Moniliophthora perniciosa* basidiomata and developmentally regulated genes. **BMC microbiology**, v. 9, p. 158, 2009.

PLOETZ, R. C. Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1634–1639, 2007.

PLOTNIKOV, A. et al. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 9, p. 1619–1633, 2011.

POLLACK, J. K.; HARRIS, S. D.; MARTEN, M. R. Autophagy in filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 1, p. 1–8, 2009.

POLONI, J. DE F. et al. *Biologia de Sistemas*. p. 116–146, 2014.

POWELL, J. F.; STRANGE, R. E. Biochemical changes occurring during the germination of bacterial spores. **The Biochemical journal**, v. 54, n. 2, p. 205–9, 1953.

PUNGARTNIK, C. et al. Reactive oxygen species and autophagy play a role in survival and differentiation of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 6–7, p. 461–472, 2009a.

PUNGARTNIK, C. et al. High-Affinity Copper Transport and Snq2 Export Permease of *Saccharomyces cerevisiae* Modulate Cytotoxicity of PR-10 from *Theobroma cacao*. **Society**,

v. 22, n. 1, p. 39–51, 2009b.

PURDY; DICKSTEIN, 1990. **Basidiocarp development on mycelial mats of *Crinipellis pernicios***, 1990.

PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. STATUS OF CACAO WITCHES' BROOM: biology, epidemiology, and management. **Annual review of phytopathology**, v. 34, p. 573–594, 1996.

QADOTA. identification of Yeast Rho1 p GTPase as a Regulatory Subunit of 1,3-P-Glucan Synthase. **Science**, v. 272, n. April, p. 279–281, 1996.

QI, Y.; NOBLE, W. S. Protein interaction networks: Protein domain interaction and protein function prediction. **Handbook of Statistical Bioinformatics**, p. 427–459, 2011.

REZENDE, A. M. et al. Computational Prediction of Protein-Protein Interactions in *Leishmania* Predicted Proteomes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

REZENDE, A. M. Predição Computacional de Interações de Proteína- Proteína em Proteomas Preditos de. 2012.

RIVALS, I. et al. Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: Which test? **Bioinformatics**, v. 23, n. 4, p. 401–407, 2007.

ROLLIN-PINHEIRO, R. et al. Sphingolipids as targets for treatment of fungal infections. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1469–1484, 2016.

SAADATPOUR, A.; ALBERT, R. Boolean modeling of biological regulatory networks: A methodology tutorial. **Methods**, v. 62, n. 1, p. 3–12, 2013.

SANTOS, R. X.; BRENDDEL, M.; PUNGARTNIK, C. Carbon source-dependent variation of acquired mutagen resistance of *Moniliophthora pernicios* : Similarities in natural and artificial systems. v. 45, p. 851–860, 2008.

SATO, T. et al. The inference of protein-protein interactions by co-evolutionary analysis is improved by excluding the information about the phylogenetic relationships. **Bioinformatics**, v. 21, n. 17, p. 3482–3489, 2005.

SAUER U., H. M.; ZAMBONI, N. Getting Closer to the Whole Picture. **Science**, v. 316, n. 5824, p. 550–551, 2007.

SCARPARI, L. M. et al. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicios*. v. 56, n. 413, p. 865–877, 2005.

SCHMELZLE, T.; HALL, M. N. TOR, a central controller of cell growth. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 253–262, 2000.

SCHMIDT, A.; SCHMELZLE, T.; HALL, M. N. The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1433–1441, 2002.

SCHWEIZER, M. et al. The pentafunctional FAS1 gene of yeast: its nucleotide sequence and order of the catalytic domains. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 203, n. 3, p. 479–486, 1986.

SCOTT, J. **Social network analysis: A handbook** SAGE Publications, 2000. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Social+Network+Analysis+A+Handbook#6>>

SENA, K.; ALEMANN, L.; GRAMACHO, K. P. The infection process of *Moniliophthora perniciosa* in cacao. **Plant Pathology**, v. 63, n. 6, p. 1272–1281, 2014a.

SENA, K.; ALEMANN, L.; GRAMACHO, K. P. The infection process of *Moniliophthora perniciosa* in cacao. **Plant Pathology**, 2014b.

SHENG ZHAO; FERNALD, R. D. Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. v. 12, n. 8, p. 1047–1064, 2009.

SHERTZ, C. A et al. Conservation, duplication, and loss of the Tor signaling pathway in the fungal kingdom. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 510, 2010.

SHIN, K. S. et al. Differential roles of the chitinase in autolysis and cell death of *Aspergillus nidulans*. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 5, p. 738–746, 2009.

SHOJI, J. Y.; KIKUMA, T.; KITAMOTO, K. Vesicle trafficking, organelle functions, and unconventional secretion in fungal physiology and pathogenicity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 20, p. 1–9, 2014.

SILVA, F. A. C. et al. Proteomic response of *Moniliophthora perniciosa* exposed to pathogenesis-related protein-10 from *Theobroma cacao*. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4855–4868, 2013.

SKRABANEK, L. et al. Computational prediction of protein-protein interactions. **Molecular Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 1–17, 2008.

SREENIVASAN, T. N.; DABYDEEN, S. **Modes of Penetration of Young Cocoa Leaves by *Crinipellis perniciosa***, 1978.

STEINBERG, G.; PEREZ-MARTIN, J. *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. **Trends in Cell Biology**, v. 18, n. 2, p. 61–67, 2008.

SUDBERY. Regulation of polarised growth in fungi. **fungal biology reviews**, v. 22, p. 44–55, 2008.

SZKLARCZYK, D. et al. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D447–D452, 2015.

TAPON, N.; HALL, A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 1, p. 86–92, 1997.

TEIXEIRA, P. J. P. L. et al. High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Cell**, v. 26, n. 11, p. 4245–4269, 2014.

- THOMAZELLA. The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. p. 1025–1034, 2012.
- VALDIVIESO, M. H. et al. Chitin synthesis in a *gas1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 17, p. 4752–4757, 2000.
- VILLELA-DIAS, C. et al. Nep1-like protein from *Moniliophthora perniciosa* induces a rapid proteome and metabolome reprogramming in cells of *Nicotiana benthamiana*. **Physiologia Plantarum**, v. 150, n. 1, p. 1–17, 2014.
- VON MERING, C. et al. STRING: Known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. DATABASE ISS., p. 433–437, 2005.
- WANG, Y. et al. AIM: A comprehensive Arabidopsis interactome module database and related interologs in plants. **Database**, v. 2014, p. 1–8, 2014.
- WEBER, M. et al. Ectopic expression of a constitutively active Cdc42 small GTPase alters the morphology of haploid and dikaryotic hyphae in the filamentous homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 7, p. 624–637, 2005.
- WILSON, R. A. et al. Towards Defining Nutrient Conditions Encountered by the Rice Blast Fungus during Host Infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–9, 2012.
- WULLSCHLEGER, S. et al. Molecular organization of target of rapamycin complex 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 35, p. 30697–30704, 2005.
- XENARIOS, I. DIP, the Database of Interacting Proteins: a research tool for studying cellular networks of protein interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 303–305, 2002.
- XIWEI ZHENG, CONG BI, MARISSA BROOKS, AND D. S. H. Sphingolipid Signaling in Fungal Pathogens. **Anal Chem.**, v. 25, n. 4, p. 368–379, 2015.
- XU, K. et al. Path lengths in protein-protein interaction networks and biological complexity. **Proteomics**, v. 11, n. 10, p. 1857–1867, 2011.
- YAMAUCHI, N. et al. Chlorophyll degradation in Wase satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit with on-tree maturation and ethylene treatment. **Scientia Horticulturae**, v. 71, n. 1–2, p. 35–42, nov. 1997.
- YAN, G.; LAI, Y.; JIANG, Y. The TOR Complex 1 Is a Direct Target of Rho1 GTPase. **Molecular Cell**, v. 45, n. 6, p. 743–753, 2012.
- YU, H. et al. Annotation Transfer Between Genomes : Protein – Protein Interologs and Protein – DNA Regulogs. **Genome Research**, p. 1107–1118, 2004.
- YU, H. et al. The importance of bottlenecks in protein networks: Correlation with gene essentiality and expression dynamics. **PLoS Computational Biology**, v. 3, n. 4, p. 713–720, 2007.
- ZHANG, F. et al. Genome-wide inference of protein interaction network and its application to the study of crosstalk in Arabidopsis abscisic acid signaling. **Plant Physiology**, v. 171, n.

June, p. pp.00057.2016, 2016.

LEGENDAS DAS FIGURAS

FIG. 1. Fluxo de trabalho com todas as etapas desenvolvidas nesta pesquisa. **1.** Busca por proteínas homólogas em *Ustilago maydis*. **2 e 3.** Construção de uma rede para identificar os primeiros alvos. **4 e 5.** Mineração da literatura para selecionar genes alvos. **6 e 7.** Elaboração de uma nova rede IPP em *Saccharomyces cerevisiae*. **8.** Análise dos Clusters de Proteína, Processo Biológico e Literatura Mineira. **9.** Obtenção do modelo celular para resposta de *M. perniciosa* ao estresse. **10.** Análise dos domínios encontrados em cada gene selecionado. **11.** Obtenção de *primers* para todos os genes alvos selecionados. **12.** PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) para todos os genes alvo selecionados de cada fase de desenvolvimento de *M. perniciosa* em cultivo artificial (bolachas). **13 e 14.** Análise estatística da expressão gênica entre os genes-alvos selecionados **15.** Associação dos resultados da expressão gênica com o modelo celular.

FIG. 2. Principais proteínas encontradas em *Ustilago maydis* que interagem com homólogas de MpCHT1, MpATG8 e MpCHS. Vide também Tabela 2) que sumariza os principais processos biológicos nos quais essas proteínas estão envolvidas.

FIG. 3. Rede de interação proteína-proteína. A figura mostra no centro a rede de PPI com os vizinhos mais próximos às proteínas selecionadas para o estudo de expressão genica. Ao redor, temos os módulos obtidos no *fastgreedy.community* e seus respectivos processos biológicos determinados pelo BiNGO com valores de significância corrigidos. Os diferentes tons de branco para vermelho representam os valores de centralidade *betweenness* (0-409954): quanto mais avermelhado, maior o valor para essa centralidade. A espessura da borda dos nós representa o valor para a centralidade *degree* (0-197): quando mais espessa a borda, maior será o valor para *degree*. Os tamanhos dos nós representam: nenhuma homologia com proteína de *M. perniciosa* (nós menores), homólogos entre *S. cerevisiae* e *M. perniciosa* (nós médios),

proteínas utilizadas na análise de expressão genica (nós maiores). As setas indicam que todos os clusters (A-I) vieram da sub-rede mostradas no centro da figura.

FIG. 4. Matriz de correlação e análise de heatmap com clusterização hierárquica baseada na expressão de genes alvo em diferentes fases de desenvolvimento (banca, amarela, rosa, rosa escuro e primórdio) de *M. pernicioso* cultivado em bolachas. **A.** Matriz de correlação de Pearson. As correlação positiva e negativa são apresentadas em vermelho e azul, respectivamente. Círculo grande de cor azul indica genes com correlação negativa, quanto mais azul, mais próximo de -1; quanto maior o círculo e mais avermelhado, mais próxima de +1 é a correlação. O “x” em A, representa o ponto de corte da correlação, valores significantes foram considerados acima de 0.3 (70%), valores abaixo desse ponto de corte foram marcados com “x”. **B.** A cor no *heatmap* representa a expressão relativa em *z-score*: quanto mais vermelho, maior que a média é o valor de expressão; quanto mais azul, menor que a média será o valor. O dendograma mostra o agrupamento dos genes com base na correlação de Pearson.

FIG. 5. Modelo celular das principais interações e vias de sinalização relacionadas ao processo biológico selecionado na rede de IPP e com base em dados da literatura. Esse modelo representa o nível de expressão dos genes, no momento do estresse.

TABELAS

Tabela 1. Homologia entre *M. pernicioso*, *U. maydis* e *S. cerevisiae*.

<i>M. pernicioso</i> ID NCBI	<i>M. pernicioso</i> x <i>U. maydis</i>				<i>M. pernicioso</i> x <i>S. cerevisiae</i>			
	Subject	Evalue	Qcov (%)	identid (%)	Subject	Evalue	Qcov (%)	identid (%)
ABRE01015241.1 (sca12.70.1*)	UM00801.1	0,00	69	41,75	Kog1	1,00E-101	56	48,99
ABRE01002388.1 (sca118.1.1*)	UM03912.1	0,00	30	61,6	Rom2	3,00E-173	37	36,05
ABRE01005366.1 (sca161.15.1*)	UM03216.1	0,00	75	51,67	Tor1	0,00	77	41,16
ABRE01022557.1 (sca287.13.1*)	UM03539.1	4,00E-56	32	40,96	Ssz1	7,00E-39	64	26,03
ABRE01018442.1 (sca5.89.1*)	UM00756.1	0,00	43	70	Gdi1	4,00E-155	44	54,62
ABRE01013085.1 (sca2.19.1*)	UM01639.1	0,00	99	65,62	Fks1	0,00E+00	99	52,1
ABRE01010224.1 (sca125.19.1*)	UM03599.1	2,00E-74	96	38,89	Ccd10	1,00E-122	95	56,15
ABRE01021873.1 (sca20.39.1*)	UM03210.1	1,00E-37	76	62,07	Cks1	4,00E-35	80	58,89
Sca54.25.1*	UM00295.1	1,00E-104	99	78,87	Cdc42	9,00E-100	99	73,71
ABRE01017644.1 (sca227.2.1*)	UM05734.1	3,00E-85	100	68,37	Rho1	1,00E-67	95	57,53
ABRE01017762.1 (sca529.1.1*)	UM00947.1	6,00E-70	33	34,74	Avo1	7,00E-13	29	36,7
EU477413.1** (sca2.201.1*)	UM05567.1	2,00E-78	92	95,73	Atg8	3,00E-64	92	76,92
EU154354.1** (sca7.82.1)	UM00474.1	3,00E-162	68	43,82	Chs2	4,00E-166	86	38,21
ABRE01017587.1** (sca330.3.1*)	UM06190.1	3,00E-43	86	30,18	Cts2	5,00E-14	68	21,78
ABRE01011675.1	UM02902.1	2,00E-65	35	46,00	Bag7	1,00E-29	26	35,00-
ABRE01009813.1** (sca3.23.1*)	UM04261.1	1,00E-134	87	48,3	Cts2	8,00E-48	70	30,13

* Sequencia não disponível no NCBI, originada de dados de sequenciamento não publicados.

** Genes estudados previamente estudados (GOMES et al., 2016)

Tabela 2. Tabela recapitulativa dos alvos selecionados em *M. pernicioso* e dos seus domínios funcionais

Homologous				
<i>M. pernicioso</i> ID code NCBI	<i>S. cerevisiae</i> gene code	Function ²	Reference	Pfam Domines in <i>M. pernicioso</i> *
ABRE01015241.1	Kog1	Subunit of TORC1; control cell growth; controls ribosome biogenesis	Adami et al., 2007; Araki et al., 2005	
ABRE01002388.1	Rom2	GDP/GTP exchange factor (GEF) for Rho1p and Rho2p;	Ozaki et al., 1996; Krause et al., 2012	
ABRE01005366.1	Tor1	Rapamycin target; subunit of TORC1; controls growth in response to nutrients Active TORC1 positively controls ribosome biogenesis	Loewith, Hall, 2012; Adami et al., 2007	
ABRE01022557.1	Ssz1	Hsp70 protein; Component of the ribosome-associated complex (RAC)	Gaustschi et al., 2001; Eisenman, Craig, 2004	
ABRE01018442.1	Gdi1	Dissociate the GDP-bound Rab proteins from the membrane and inhibits their activation; secretory pathway	Garrett, et al., 1994; Collins et al., 1997	
ABRE01013085.1	Fks1	Catalytic subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase; cell wall synthesis and maintenance	Garcia et al., 2017; Levin, 2011	
ABRE01010224.1	Cdc10	Component of the septin ring; bud emergence and cytokinesis	Vrabioiu et al., 2004; Wloka et al., 2011; McMurray et al., 20011	
ABRE01021873.1	Cks1	Cyclin-dependent protein kinase; modulates proteolysis of M-phase targets	Kõivomägi et al., 2011	
Sca54.25.1	Cdc42	Small GTPase; Maintenance of cell polarity; organization of actin and septins	Perez; Rincon, 2010; Gladfelter et al., 2002	
ABRE01017644.1	Rho1	Establishment of cell polarity; regulates protein kinase C (PKC1p) and FKS1	Nonaka et al., 1995; Martínez-Rocha et al., 2008	
ABRE01017762.1	Avo1	Component of complex TORC2; regulation of cell growth; cell wall integrity; polarity of the actin cytoskeleton; orienting the secretory pathway	Loewith, Hall, 2012; Adami et al., 2007	
EU477413.1	Atg8	Component of autophagosomes and Cvt vesicles; phagophore expansion;	Xie et al., 2008; Nair et al., 2009	
EU154354.1	Chs2	chitin synthesis in the primary septum during cytokinesis septum formation and cell division; normal cell morphology	Schmidt et al., 2001; Oh et al., 2012	
ABRE01017587.1	Cts2	Putative chitinase	Dunkler et al., 2008	
ABRE01009813.1	Cts2	Putative chitinase	Dunkler et al., 2008	
ABRE01011675.1	Bag7/Sac7	GTPase for Rho1; plays a role in actin cytoskeleton; cell wall synthesis	Schmidt et al., 2002; Bickle et al., 1998 Lockshon et al., 2012	

*Relação de homologia entre *M. pernicioso* e *S. cerevisiae* e domínios do Pfam encontrados nesses homólogos em *M. pernicioso*. Raptor_N Raptor (N-terminal CASPase like domain), Atg8 (Autophagy protein Atg8 domine), BAR_2 (Bin Amphiphysin Rvs domine), Chitin_synth_1 (Chitin synthase 1 domine), Chitin_synth_2 (Chitin synthase 2 domine), CKS (Cyclin-dependent kinase domine), CNH (Citron homology domine), CRIM (SAPK-interacting protein 1 domine), FAT (Focal Adhesion kinase, Targeting domain), GDI (GDP dissociation inhibitor domine), Glucan_synthase (1,3-beta-glucan synthase domine), Glyco_hydro_18 (Glycosyl

8 hydrolases family 18 domine), HSP70 (Heat Shock Proteins 70 domine), PI3_PI4_kinase (Phoshatidylinositol 3 and 4-Kinase domine), Polysacc_deac_1
9 (Polysaccharide deacetylase 1 domine), Ras (Ras family domine), RhoGEF (Ras HOMolog Guanine Exchange Factor domain), Sec1 (SECreatory 1 family domine),
10 Septin (Septin domine), * (not characterized domain on PFAM).

11

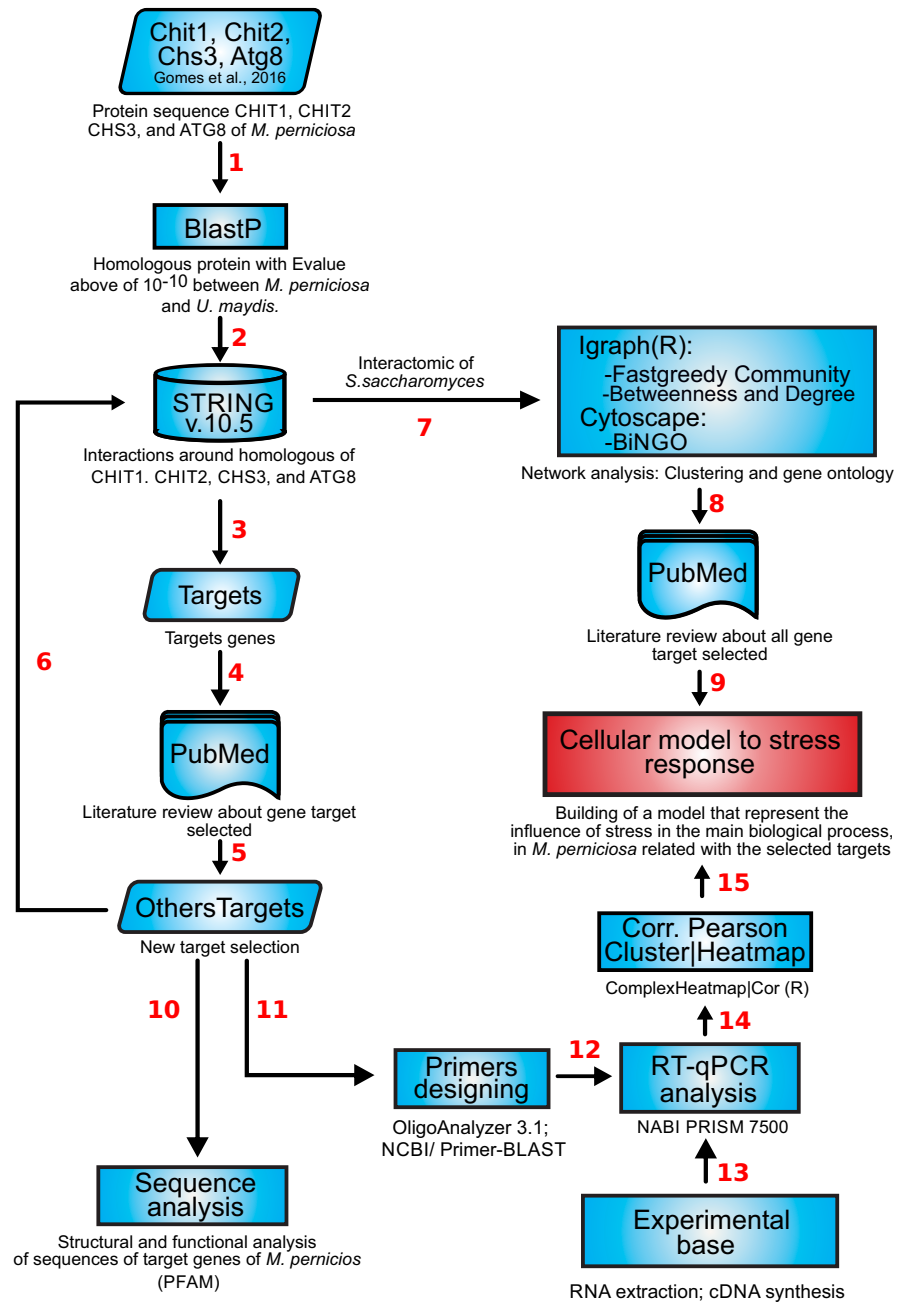


FIG. 1. Silva et al

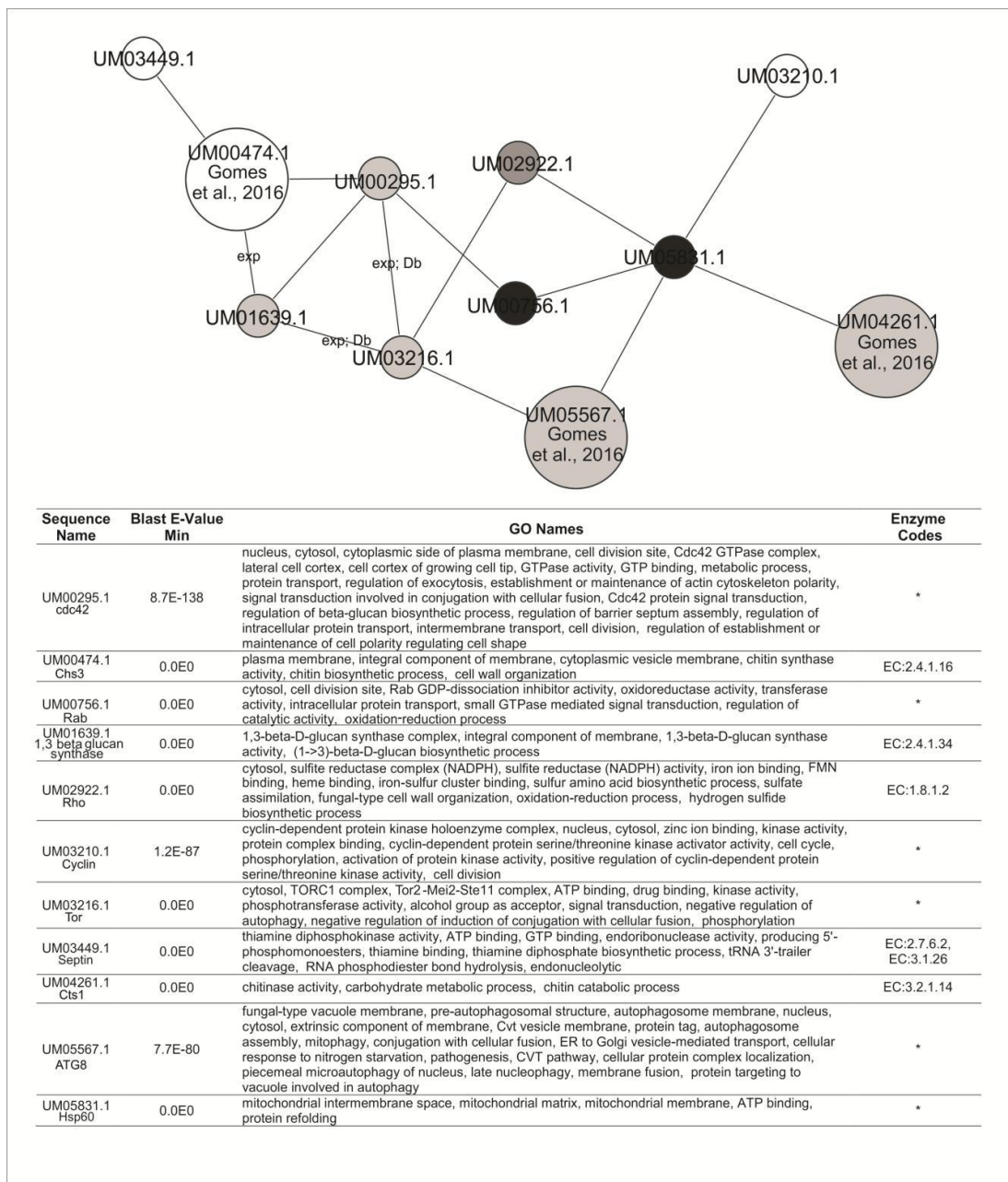
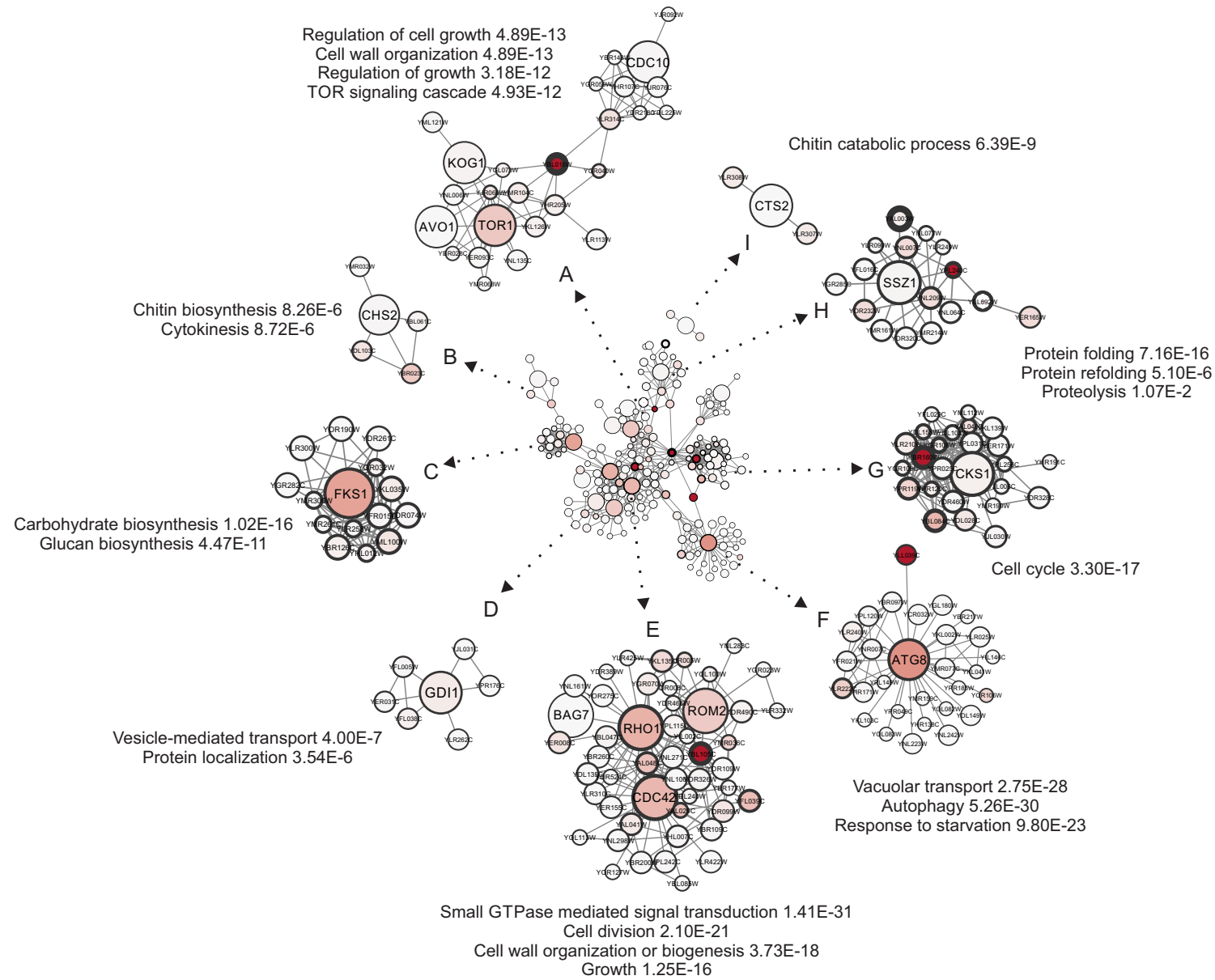
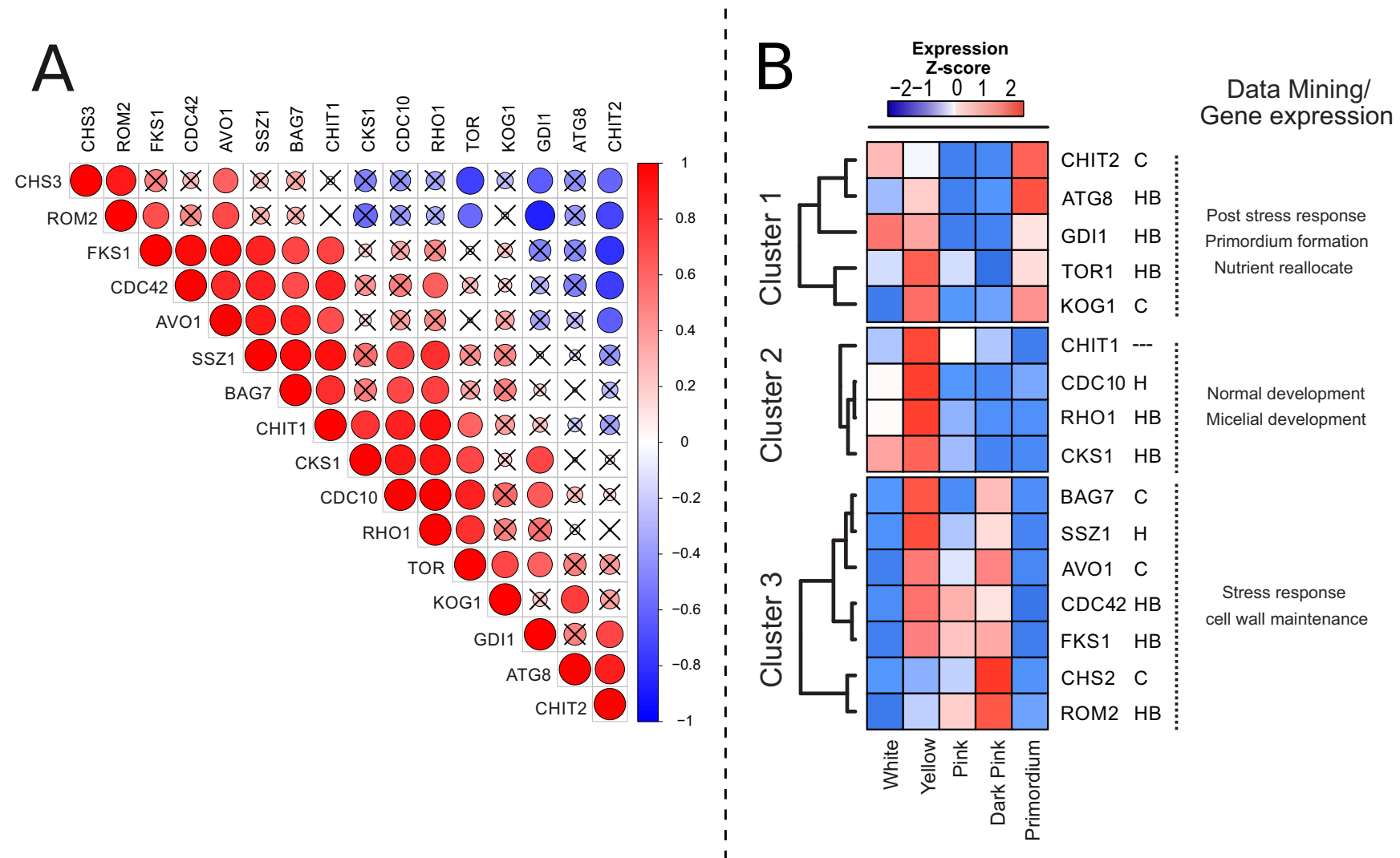


FIG. 2. Silva et al





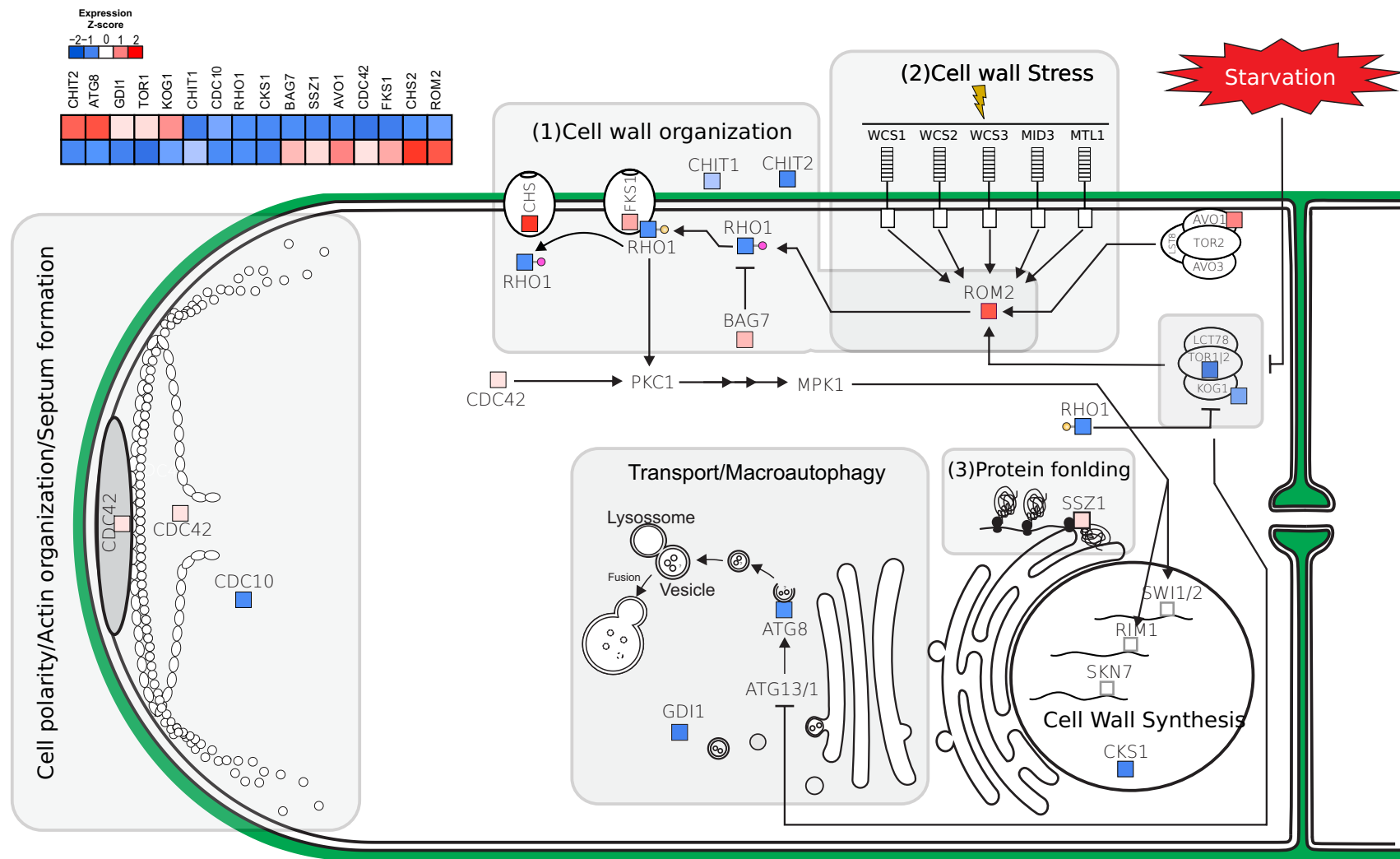


FIG. 5. Silva et al

MATERIAL SUPLEMENTAR

Material suplementar 1. Comparação entre os domínios presentes nas proteínas homólogas entre *M. pernicioso*, *U. maydis* e *S. cerevisiae*.

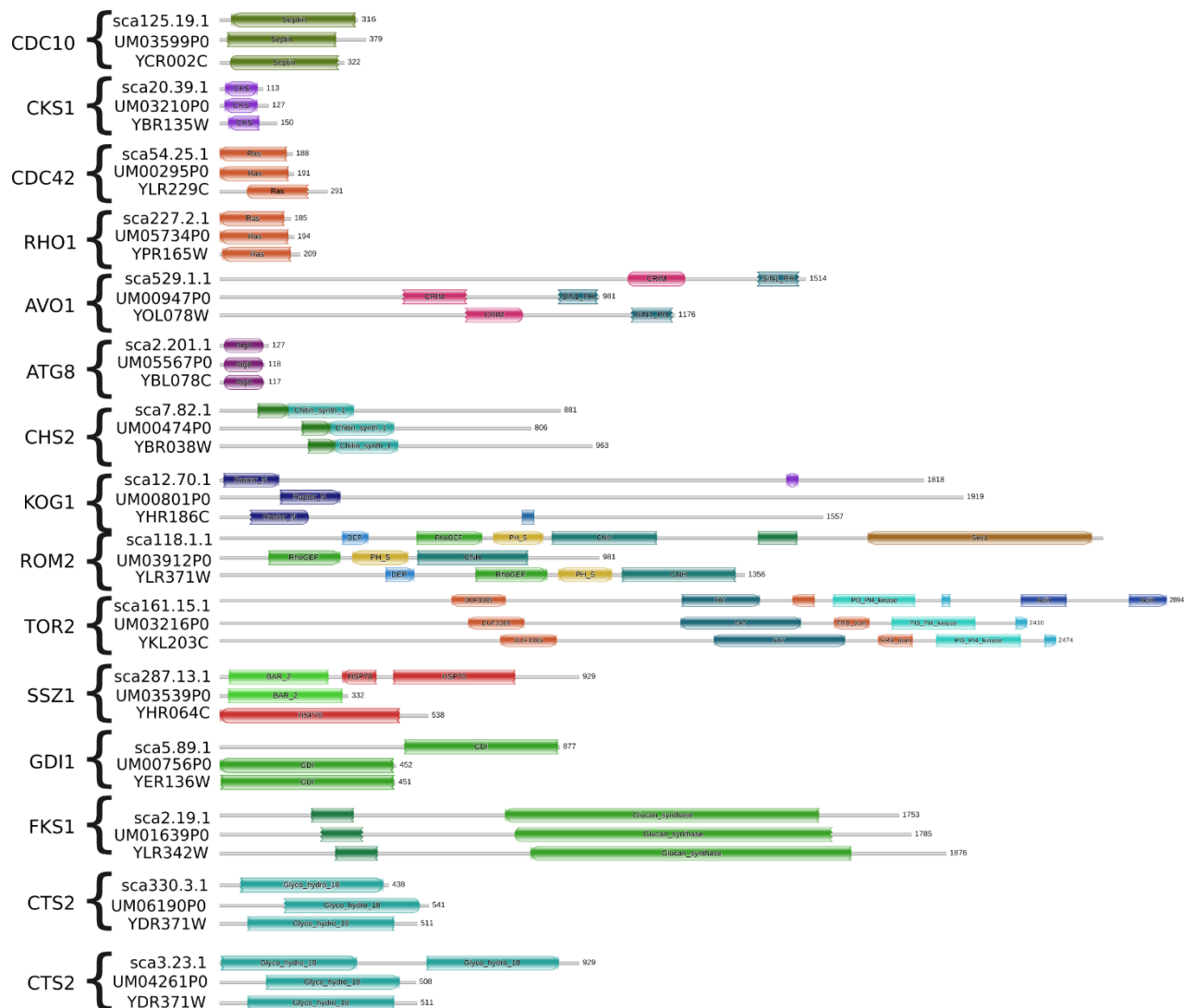


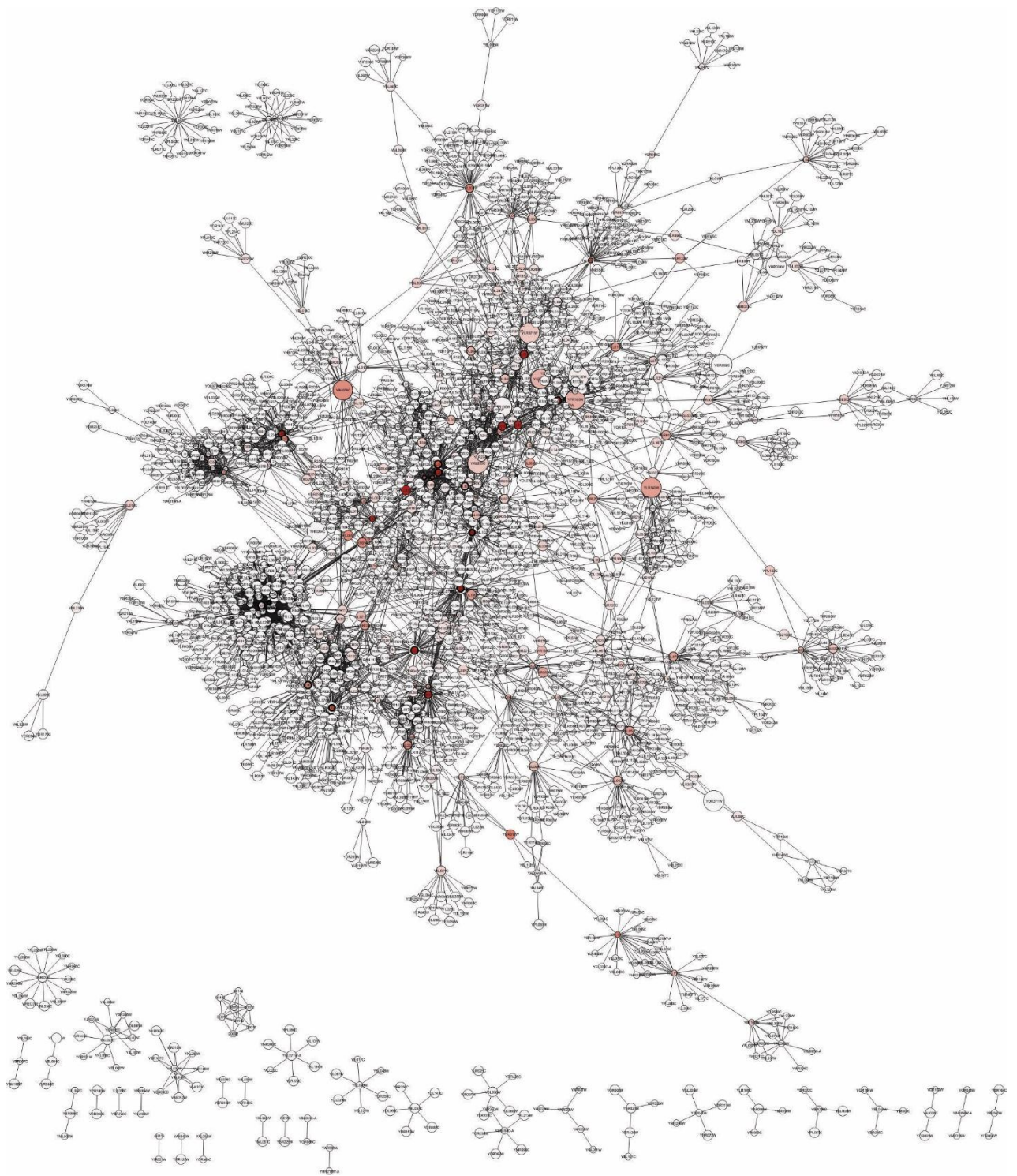
FIG. 6. Silva et al

Material suplementar 2: *Primers utilizados para a análise de qPCR*

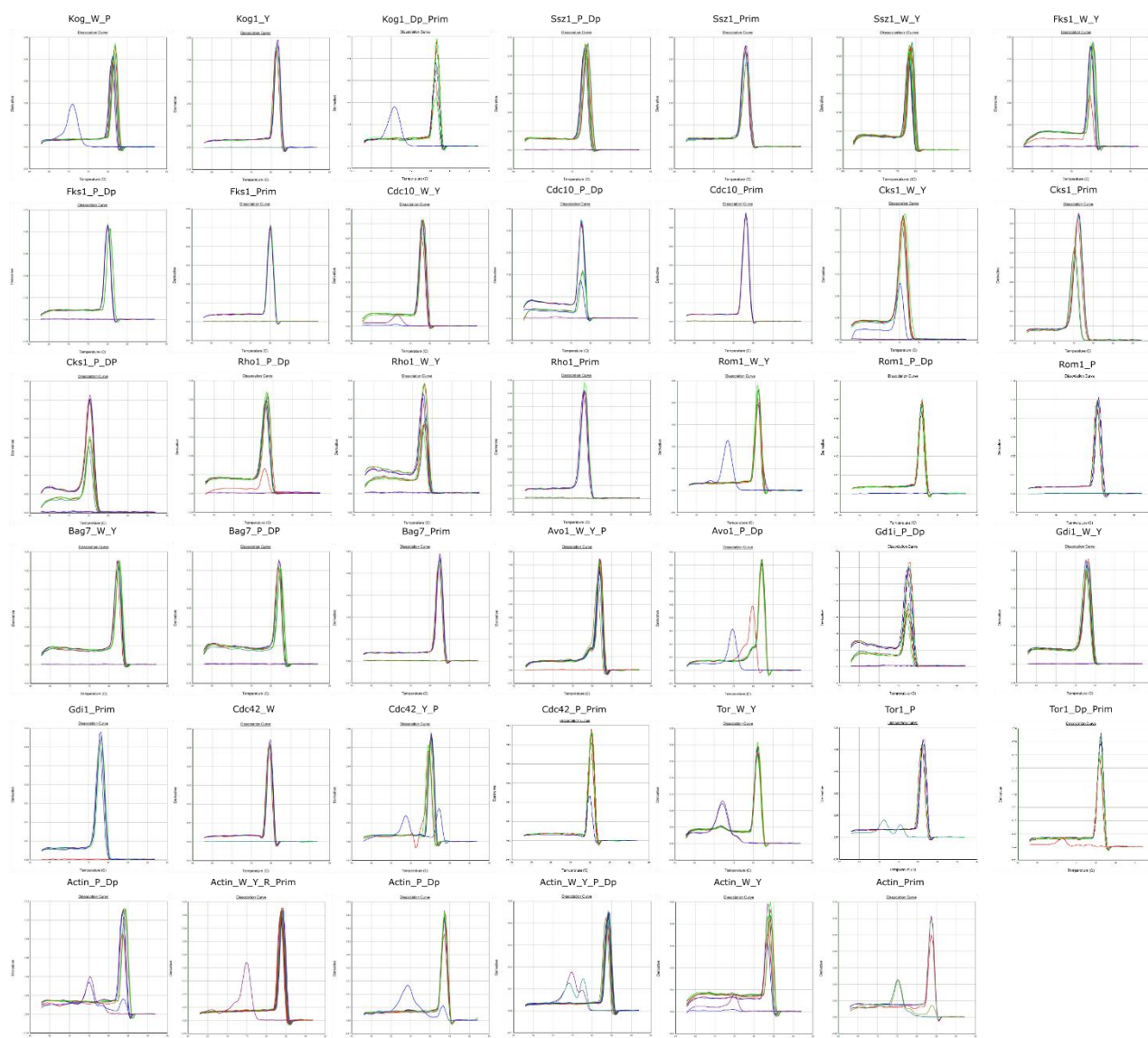
ID NCBI	Sense	5' → 3'	GC	Tm (°C)	Length (pb)
ABRE01015241.1	F	TGTGCTCATTTCATACTGGCTG	47,6	55,1	188
	R	GACACCGATCATCTTTCCCTC	52,4	55,1	
ABRE01002388.1	F	GAGAAGGAGAAGAACGGGAAT	47,6	54,1	160
	R	GTGTGTGATTGATGACGGCT	50,0	55,5	
ABRE01005366.1	F	ACGAAGACCGAAGGGAGATT	50,0	55,7	144
	R	GATGAATCGACAGGATGGCT	50,0	54,6	
ABRE01022557.1	F	GGTTCGCACCTTCTGGATAC	55,0	55,6	98
	R	ATTACGTCCCGCTTCTTCAG	50,0	54,7	
ABRE01018442.1	F	GTTGCCAGATCATCATTCCC	50,0	53,7	80
	R	GTTATGCGTTGAGGAGACCA	50,0	54,7	
ABRE01013085.1	F	GGTGGTGAGGCGAGATTATT	50,0	54,6	140
	R	TTCTGGTTATCCGACTTCCC	50,0	54,0	
ABRE01010224.1	F	CAAATCACCAATGAGGGATGC	47,6	54,3	132
	R	GAGGCAGCAGTGAATACGAG	55,0	55,5	
ABRE01021873.1	F	AGTTGCGACAAGAACGAATG	45,0	53,6	68
	R	GCATGTGTTACTGCTTCCG	50,0	54,5	
Sca54.25.1*	F	TGTAGTTGTTGGTGATGGTGC	52,4	55,5	82
	R	CGATGTTACACTGAAGCAGACG	55,0	55,5	
ABRE01017644.1	F	CGACCCTAGAGTGATTGAGGA	52,4	55,5	82
	R	CTTCTGAGCGACAGCCATAC	55,0	55,5	
ABRE01017762.1	F	TCAGACGAAGAACCATCACG	50,0	57,6	189
	R	GACGATGTGGTCCGAGATTT	50,0	57,7	
ABRE01011675.1	F	CAAATCACCAATGAGGGATGC	55,0	56,6	151
	R	GGTTCTTGCCATATCGAGGT	50,0	54,6	

*Transcrito não disponível no GenBank, encontrado em um novo sequenciamento de *M. perniciosa*, não publicado

Material suplementar 3. Rede de interação proteína-proteína de *Saccharomyces cerevisiae*. Nós muito grandes, que são os homólogos entre *M. perniciosus* e *S. cerevisiae* que foram estudados por expressão genica em *M. perniciosus* durante seu desenvolvimento em bran-based solid médium. Esses genes junto com os nós de tamanho médio, são homólogos entre esses dois fungos. A cor varia numa escala de vermelho proporcionalmente ao valor para a centralidade betweenness, enquanto a largura da borda no nó indica varia proporcionalmente com o valor para a centralidade degree.



Material suplementar 5. Curvas de dissociação do qPCR dos alvos estudados em *M. perniciosus*. W: fase branca; Y: fase amarela; P: fase rosa; Dp: fase rosa escuro e P: primórdio.



REFERÊNCIAS

- ABBASI, A.; HOSSAIN, L.; LEYDESDORFF, L. Betweenness centrality as a driver of preferential attachment in the evolution of research collaboration networks. **Journal of Informetrics**, v. 6, n. 3, p. 403–412, 2012a.
- ABBASI, A.; HOSSAIN, L.; LEYDESDORFF, L. Betweenness centrality as a driver of preferential attachment in the evolution of research collaboration networks. **Journal of Informetrics**, v. 6, n. 3, p. 403–412, 2012b.
- ADAMI, A. et al. Structure of TOR and Its Complex with KOG1. **Molecular Cell**, v. 27, n. 3, p. 509–516, 2007.
- AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v. 97, n. 5, p. 1012–1022, 1 set. 2005.
- ALBERT, R.; JEONG, H.; BARABÁSI, A.-L. Error and attack tolerance of complex networks. **Nature**, v. 406, n. 6794, p. 378–382, 27 jul. 2000.
- ARGÔLO SANTOS CARVALHO, H. et al. Polygalacturonases from *Moniliophthora perniciosa* are regulated by fermentable carbon sources and possible post-translational modifications. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 60, p. 110–21, nov. 2013.
- BADER, G. D.; HOGUE, C. W. V. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. **BMC Bioinformatics**, v. 4, n. 1, p. 2, 2003.
- BARABÁSI, A.-L. Network science: the Barabási-albert model. **Network Science**, 2015.
- BARABÁSI, A.-L. The Scale-Free Property. **Network Science**, p. 474 pages, 2016.
- BARABÁSI, A.-L.; ALBERT, R. Emergence of Scaling in Random Networks. **Science**, v. 286, n. October, p. 509–512, 1999.
- BARABASI, A. L.; OLTVAI, Z. N. Network Biology: Understanding the Cell's Functional Organization. **Nature Review**, v. 5, n. February, p. 101–113, 2004.
- BASTOS, C N; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology**, n. 1981, p. 306–312, 1985.
- BASTOS, C. N.; ANDEBRHAN, T. In vitro production of basidiospores of *Crinipellis perniciosa*, the causative agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, n. 3, p. 406–409, 1987.
- BAVELAS, A. A Mathematical Model for Group Structures. **Human Organization**, v. 7, n. 3, p. 16–30, 1948.
- BENJAMINI, Y. et al. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. **Behavioural brain research**, v. 125, n. 1–2, p. 279–84, 1 nov. 2001.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Source Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological) Journal of the Royal Statistical Society. Series B(Methodological) J. R. Statist. Soc. B**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 14 nov. 1995.

- BICKLE, M. et al. Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. **EMBO Journal**, v. 17, n. 8, p. 2235–2245, 1998.
- BÖLKER, M. *Ustilago maydis* - A valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. **Microbiology**, v. 147, n. 6, p. 1395–1401, 2001.
- BONATTO, D.; NAKAYA, H. T. I. Genômica e biologia de sistemas. In: INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (Ed.). . **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações**. Cambridge: Cambridge University Press, 2016. v. 1p. 227–302.
- BORGES, A. C. Total Lipid and Fatty Acid Accumulation During Basidiospore Formation in the Ectomycorrhizal. n. 1, p. 1531–1540, 2008.
- BORKOVICH, KATHERINE A. EBBOLE, D. J. Cellular and molecular biology of filamentous fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 157–158, jan. 2010a.
- BORKOVICH, KATHERINE A. EBBOLE, D. J. Filamentous Fungi. **American Society for Microbiology Press**, v. 9, n. 2, p. 157–158, jan. 2010b.
- BOTSTEIN, D.; CHERVITZ, S. A.; CHERRY, J. M. Yeast as a model organism. **Science (New York, N.Y.)**, v. 277, n. 5330, p. 1259–60, 29 ago. 1997.
- BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, n. 8, p. 799–808, 2006.
- BOYCE, K. J.; A., A. **Morphogenesis: Control of Cell Types and Shape**. [s.l: s.n.].
- BRANDES, U.; ERLEBACH, T. **Network Analysis: Methodological Foundations**. [s.l: s.n.]. v. 3418
- BREITLING, R. What is systems biology? **Frontiers in Physiology**, v. 1 MAY, n. May, p. 1–5, 2010.
- BRUN, L. A.; CORFF, J. LE; MAILLET, J. Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species. **Environmental Pollution**, v. 122, p. 361–368, 2003.
- BRYAN A. BAILEY LYNDEL W. MEINHARDT. **Cocoa Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters**. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 101
- BUCHFINK, B.; XIE, C.; HUSON, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p. 59–60, 2014.
- BUSHNELL, B. BBMap : A Fast , Accurate , Splice-Aware Aligner. **LBNL Department of Energy Joint Genome Institute**, p. 3–5, 2014.
- CARDON, C. M. et al. PAS Kinase Promotes Cell Survival and Growth Through Activation of Rho1. **Science Signaling**, v. 5, n. 209, p. ra9-ra9, 2012.
- CASCANTE, M. et al. Metabolic control analysis in drug discovery and disease. **Metabolic control analysis in drug discovery and disease.**, v. 20, n. 3, p. 243–249, 2002.
- CHANG, Y. Y. et al. Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway. **Biochem Soc Trans**, v. 37, n. Pt 1, p. 232–236, 2009.
- CHATR-ARYAMONTRI, A. et al. The BioGRID interaction database: 2017 update. **Nucleic**

Acids Research, v. 45, n. D1, p. D369–D379, 2017.

CLAUSET, A.; NEWMAN, M. E. J.; MOORE, C. Finding community structure in very large networks. p. 1–6, 2004.

CONESA, A. et al. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674–3676, 2005.

CRUZ ET AL., 2011. Efecto del Azoxystrobin Sobre Moniliophthora roreri, Agente Causal de la Moniliasis del Cacao (Theobroma cacao). **REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA**, v. 31, p. 65–69, 2013.

CSÁRDI, G.; NEPUSZ, T. The igraph software package for complex network research. **InterJournal Complex Systems**, v. 1695, p. 1–9, 2006.

CUI, T. et al. Uncovering new signaling proteins and potential drug targets through the interactome analysis of Mycobacterium tuberculosis. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 118, 2009.

DA HORA JUNIOR, B. T. et al. Transcriptomics and systems biology analysis in identification of specific pathways involved in cacao resistance and susceptibility to witches' broom disease. **Molecular bioSystems**, v. 8, n. 5, p. 1507–19, abr. 2012.

DAVID, R. Cell signalling: Rho1 keeps an eye on TORC1. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 5, p. 280–281, 2012.

DE ARRUDA, M. C. C. et al. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in Crinipellis pernicioso from different geographic origins and hosts. **Mycological research**, v. 107, n. Pt 1, p. 25–37, 2003.

DELGADO, J. C.; COOK, A. A. Nuclear condition of the basidia, basidiospores, and mycelium of Marasmius perniciosus. **Canadian Journal of Botany**, v. 54, n. 1, p. 66–72, 1976.

DÍAZ-JIMÉNEZ, D. F. et al. Role of the fungal cell wall in pathogenesis and antifungal resistance. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 4, p. 275–282, 2012.

DRGONOVA, J. et al. Yeast Protein. v. 272, n. April, p. 1995–1997, 1996.

DRGONOVÁ, J. et al. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 272, n. 5259, p. 277–279, 1996.

DÜNKLER, A.; JORDE, S.; WENDLAND, J. An Ashbya gossypii cts2 mutant deficient in a sporulation-specific chitinase can be complemented by Candida albicans CHT4. **Microbiological Research**, v. 163, n. 6, p. 701–710, 2008.

EL-AKHAL, M. R. et al. Proteomic analysis of conidia germination in Colletotrichum acutatum. **Archives of Microbiology**, v. 195, n. 4, p. 227–246, 2013.

ENRIGHT, A. J. et al. Protein interaction maps for complete genomes based on gene fusion events. **Nature**, v. 402, n. 6757, p. 86–90, 1999.

EVANS, B. Y. H. C. Witches' broom disease of cocoa. p. 185–192, 1978.

EVANS, H. C. Pleomorphism in Crinipellis pernicioso, causal agent of witches' broom

disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, n. 3, p. 515–523, 1980.

FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database. **Nucleic acids research**, v. 36, n. Database issue, p. D281–8, jan. 2008.

FINN, R. D. et al. IPfam: A database of protein family and domain interactions found in the Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 364–373, 2014.

FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D279–D285, 2016.

FLÓREZ, A. F. et al. Protein network prediction and topological analysis in *Leishmania major* as a tool for drug target selection. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 484, 2010.

FONSECA-GARCÍA, C.; LEÓN-RAMÍREZ, C. G.; RUIZ-HERRERA, J. The regulation of different metabolic pathways through the Pal/Rim pathway in *Ustilago maydis*. **FEMS yeast research**, v. 12, n. 5, p. 547–56, ago. 2012.

FREEMAN, L. C. Centrality in Social Networks Conceptual Clarification. **Social Networks**, v. 1, n. 1968, p. 215–239, 1978.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. **Our paths might cross: The role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways** *Eukaryotic Cell*, 2009a.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Our paths might cross: The role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 11, p. 1616–1625, 2009b.

G. ALMEIDDA. Estudo da função biológica da Oxidase Alternativa (AOX) de *Moniliophthora perniciosa* (fungo da vassoura de bruxa) em *Saccharomyces cerevisiae*. 2014.

GARCÍA, R. et al. A novel connection between the Cell Wall Integrity and the PKA pathways regulates cell wall stress response in yeast. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5703, 2017.

GARZÓN, J. I. et al. A computational interactome and functional annotation for the human proteome. **eLife**, v. 5, n. OCTOBER2016, p. 1–27, 2016.

GAVIN, A.-C. et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 141–147, 2002.

GESTEIRA, A. S. et al. Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora perniciosa*. **Annals of botany**, v. 100, n. 1, p. 129–40, jul. 2007.

GLADFELTER, A. S. et al. Septin ring assembly involves cycles of GTP loading and hydrolysis by Cdc42p. **Journal of Cell Biology**, v. 156, n. 2, p. 315–326, 2002.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy : cellular and molecular mechanisms. **The Journal of Pathology**, v. 221, n. 1, p. 3–12, 2010.

GOMES, D. S. et al. Mycelial development preceding basidioma formation in *Moniliophthora perniciosa* is associated to chitin, sugar and nutrient metabolism alterations involving autophagy. **Fungal Genetics and Biology**, v. 86, p. 33–46, 2016.

GRIFFITH, G. W. et al. Witches' brooms and frosty pods: Two major pathogens of cacao. **New Zealand Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p. 423–435, 2003.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis pernicios* using a bran-vermiculite medium. v. 99, p. 227–230, 1993.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis*. v. 72, n. August 1993, p. 278–289, 1994.

GU, Z.; EILS, R.; SCHLESNER, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics**, v. 32, n. 18, p. 2847–2849, 2016.

GUARRO, J.; PIETRO, A. DI. Rho1 has distinct functions in morphogenesis, cell wall biosynthesis and virulence of. v. 10, n. February, p. 1339–1351, 2008.

HARRINGTON, E. D.; JENSEN, L. J.; BORK, P. Predicting biological networks from genomic data. **FEBS Letters**, v. 582, n. 8, p. 1251–1258, 2008.

HE, F. et al. The prediction of protein-protein interaction networks in rice blast fungus. **BMC genomics**, v. 9, p. 519, 2008.

HEDGER, J. N.; PICKERING, V.; ARAGUNDI, J. Variability of populations of the witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicios*). **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, n. 4, p. 533–546, 1987.

HERMJAKOB, H. et al. IntAct: an open source molecular interaction database. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, n. Database issue, p. D452–5, 2004.

HO, Y. et al. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 180–183, 10 jan. 2002.

HUYNEN, M. A.; BORK, P. Measuring genome evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 11, p. 5849–5856, 1998.

IANIRI, G.; INDRUM, AL. Essential Gene Discovery in the Basidiomycete *Cryptococcus neoformans* for Antifungal Drug Target Prioritization. **mBio**, v. 6, n. 2, p. 1–18, 2015.

ISSERLIN, R.; EL-BADRAWI, R. A.; BADERY, G. D. The biomolecular interaction network database in PSI-MI 2.5. **Database**, v. 2011, n. May, p. 1–16, 2011.

ITO, T. et al. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 8, p. 4569–74, 2001.

JAFFE, A. B.; HALL, A. Rho GTPases: Biochemistry and Biology. p. 247–272, 2005.

JEONG, H. et al. The large scale organization of metabolic networks. **Nature**, v. 407, n. 6804, p. 651–654, 2000.

JEONG, H. et al. Lethality and centrality in protein networks. **Nature**, v. 411, n. 6833, p. 41–42, 2001.

JONES, A. M. et al. Border Control--A Membrane-Linked Interactome of *Arabidopsis*. **Science**, v. 344, n. 6185, p. 711–716, 2014.

KANEKO; ISHII, 2015. Effect of azoxystrobin on activities of antioxidant enzymes and

alternative oxidase in wheat head blight pathogens... **J Gen Plant Pathol**, v. 75, n. January, p. 388–398, 2015.

KELEKAR, A. Autophagy. v. 271, p. 259–271, 2005.

KESHAVA PRASAD, T. S. et al. Human Protein Reference Database - 2009 update. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 767–772, 2009.

KHURI, S.; WUCHTY, S. Essentiality and centrality in protein interaction networks revisited. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2015.

KIM, J.-G. et al. Predicting the interactome of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* for target selection and DB service. **BMC bioinformatics**, v. 9, p. 41, 2008.

KITAMURA, A. et al. Discovery of a Small-Molecule Inhibitor of -1,6-Glucan Synthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 670–677, 1 fev. 2009.

KLIONSKY, D. J. Autophagy: From phenomenology to molecular understanding in less than a decade. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 11, p. 931–937, 2007.

KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 185–202, 2006.

KOKKELINK, L. et al. The small GTPase BcCdc42 affects nuclear division, germination and virulence of the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 11, p. 1012–1019, 2011.

KÜES; NAVARRO-GONZÁLEZ, 2010. Mating-type orthologous genes in the primarily homothallic *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of Witches' Broom Disease in cacao. **Journal of Basic Microbiology**, v. 50, p. 442–451, 2010.

KURTZ, M. B.; REX, J. H. Glucan synthase inhibitors as antifungal agents. **Advances in Protein Chemistry**, v. 56, p. 423–475, 2001.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, 2012.

LEE, I. et al. A single gene network accurately predicts phenotypic effects of gene perturbation in *Caenorhabditis elegans*. **Nature genetics**, v. 40, n. 2, p. 181–8, 2008.

LEVIN, D. E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. **Genetics**, v. 189, n. 4, p. 1145–1175, 2011.

LEVINE, B. et al. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. **Developmental cell**, v. 6, n. 4, p. 463–77, 2004.

LICATA, L. et al. MINT, the molecular interaction database: 2012 Update. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. 857–861, 2012.

LIN, M. et al. The Predicted Arabidopsis Interactome Resource and Network Topology-Based Systems Biology Analyses. **The Plant Cell**, v. 23, n. 3, p. 911–922, 2011.

LIU, J.; BALASUBRAMANIAN, M. K. 1,3-beta-Glucan synthase: a useful target for antifungal drugs. **Current drug targets. Infectious disorders**, v. 1, n. 2, p. 159–69, 2001.

LIU, S. et al. A computational interactome for prioritizing genes associated with complex

agronomic traits in rice (*Oryza sativa*). **The Plant Journal**, v. 90, n. 1, p. 177–188, abr. 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

LOCKSHON, D. et al. Rho Signaling Participates in Membrane Fluidity Homeostasis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–10, 2012.

LOEWITH, R. et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. **Molecular Cell**, v. 10, n. 3, p. 457–468, 2002.

LOEWITH, R.; HALL, M. N. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. **Genetics**, v. 189, n. 4, p. 1177–1201, 2011.

MADDEN, K.; SNYDER, M. Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. p. 687–744, 1998.

MAERE, S.; HEYMANS, K.; KUIPER, M. BiNGO: A Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3448–3449, 2005.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D222–D226, 2015.

MARCOTTE, E. M. et al. Detecting Protein Function and Protein-Protein Interactions from Genome Sequences. **Science (New York, N.Y.)**, v. 285, n. 5428, p. 751–753, 2014.

MARELLI, J. et al. Infection Biology of *Moniliophthora perniciosa* on *Theobroma cacao* and Alternate Solanaceous Hosts. p. 149–160, 2009.

MARES, J. H. et al. Protein profile and protein interaction network of *Moniliophthora perniciosa* basidiospores. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 120, 2016a.

MARES, J. H. et al. Protein profile and protein interaction network of *Moniliophthora perniciosa* basidiospores. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 120, 2016b.

MARES, J. H. et al. Proteomic analysis during of spore germination of *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease in cacao. p. 1–10, 2017.

MATTHEWS, L. R. et al. Identification of Potential Interaction Networks Using Sequence-Based Searches for Conserved Protein-Protein Interactions or ' ' Interologs ' ' Identification of Potential Interaction Networks Using Sequence-Based Searches for Conserved Protein-Protein Inte. **Genome Research**, p. 2120–2126, 2001.

MCCANN, M. P.; SNETSELAAR, K. M. A genome-based analysis of amino acid metabolism in the biotrophic plant pathogen *Ustilago maydis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. SUPPL. 1, p. 77–87, 2008.

MEINHARDT, L. W. et al. In Vitro Production of Biotrophic-Like Cultures of *Crinipellis perniciosa* , the Causal Agent of Witches ' Broom Disease of *Theobroma cacao*. v. 52, p. 191–196, 2006.

MEINHARDT, L. W. et al. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom

disease of cacao: What's new from this old foe? **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 5, p. 577–588, 2008.

MELO, S. C. et al. Altered phenotypes in *saccharomyces cerevisiae* by heterologous expression of basidiomycete *moniliophthora perniciosa* SOD2 gene. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 12324–12344, 2015.

MONDEGO ET AL., 2008. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. **BMC Genomics**, v. 25, p. 1–25, 2008.

MORENO-HAGELSIEB, G.; LATIMER, K. Choosing BLAST options for better detection of orthologs as reciprocal best hits. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 24, n. 3, p. 319–24, 1 fev. 2008.

NAIR, U. et al. SNARE proteins are required for macroautophagy. **Cell**, v. 146, n. 2, p. 290–302, 2011.

NEIMAN, A. M. Ascospore Formation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Ascospore Formation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 69, n. 4, p. 565–584, 2005.

NEWMAN, M. E. J. Fast algorithm for detecting community structure in networks. n. 2, p. 1–5, 2003.

NOIR, S. et al. A proteomic analysis of powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) conidiospores. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 2, p. 223–236, 2009.

NONAKA, H. et al. A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO journal**, v. 14, n. 23, p. 5931–5938, 1995.

OGATA, H. et al. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 1, p. 29–34, 1999.

OH, Y. T. et al. Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, n. 3, p. 246–253, 2010.

OLIVEIRA; LUZ, 2005. **Identificação e Manejo das Principais Doenças do Cacaueiro no Brasil**. [s.l: s.n.].

ONISHI, J. et al. Discovery of novel antifungal (1,3)-beta-D-glucan synthase inhibitors. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 368–377, 2000.

OZAKI, K. et al. Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO journal**, v. 15, n. 9, p. 2196–207, 1996.

P. ERDÖS, A. R. The Evolution of Random Graphs. **Transactions of the American Mathematical Society**, v. 286, n. 1, p. 257, 1984.

PARK, D. et al. Comparative interactomics analysis of protein family interaction networks using PSIMAP (protein structural interactome map). **Bioinformatics**, v. 21, n. 15, p. 3234–3240, 2005.

PEARSON, W. R. An introduction to sequence similarity (“homology”) searching. **Current**

Protocols in Bioinformatics, n. SUPPL.42, p. 1–8, 2013.

PEREZ, P.; RINCÓN, S. A. Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. **Biochemical Journal**, v. 426, n. 3, p. 243–253, 2010.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e–45, 2001.

PHIZICKY, E. M.; FIELDS, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 94–123, 1995.

PICKERI; HEDGER, 1987. PRODUCTION OF BASIDIOCARPS OF THE COCOA PATHOGEN CRINIPPELLIS PERNICIOSA IN IN VITRO CULTURE. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 25, p. 2–4, 1987.

PINTO, L. R. M.; PIRES, J. L. Seleção de plantas de cacau resistentes à vassoura-de-bruxa. p. 35 p (Boletim Técnico No 181), 1998.

PIRES, A. B. L. et al. Early development of *Moniliophthora perniciosa* basidiomata and developmentally regulated genes. **BMC microbiology**, v. 9, p. 158, 2009.

PLOETZ, R. C. Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1634–1639, 2007.

PLOTNIKOV, A. et al. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 9, p. 1619–1633, 2011.

POLLACK, J. K.; HARRIS, S. D.; MARTEN, M. R. Autophagy in filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 1, p. 1–8, 2009.

POLONI, J. DE F. et al. *Biologia de Sistemas*. p. 116–146, 2014.

POWELL, J. F.; STRANGE, R. E. Biochemical changes occurring during the germination of bacterial spores. **The Biochemical journal**, v. 54, n. 2, p. 205–9, 1953.

PUNGARTNIK, C. et al. Reactive oxygen species and autophagy play a role in survival and differentiation of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 6–7, p. 461–472, 2009a.

PUNGARTNIK, C. et al. High-Affinity Copper Transport and Snq2 Export Permease of *Saccharomyces cerevisiae* Modulate Cytotoxicity of PR-10 from *Theobroma cacao*. **Society**, v. 22, n. 1, p. 39–51, 2009b.

PURDY; DICKSTEIN, 1990. **Basidiocarp development on mycelial mats of *Crinipellis perniciosa***, 1990.

PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. STATUS OF CACAO WITCHES' BROOM: biology, epidemiology, and management. **Annual review of phytopathology**, v. 34, p. 573–594, 1996.

QADOTA. identification of Yeast Rho1 p GTPase as a Regulatory Subunit of 1,3-P-Glucan Synthase. **Science**, v. 272, n. April, p. 279–281, 1996.

QI, Y.; NOBLE, W. S. Protein interaction networks: Protein domain interaction and protein

- function prediction. **Handbook of Statistical Bioinformatics**, p. 427–459, 2011.
- REZENDE, A. M. et al. Computational Prediction of Protein-Protein Interactions in Leishmania Predicted Proteomes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.
- REZENDE, A. M. Predição Computacional de Interações de Proteína- Proteína em Proteomas Preditos de. 2012.
- RIVALS, I. et al. Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: Which test? **Bioinformatics**, v. 23, n. 4, p. 401–407, 2007.
- ROLLIN-PINHEIRO, R. et al. Sphingolipids as targets for treatment of fungal infections. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1469–1484, 2016.
- SAADATPOUR, A.; ALBERT, R. Boolean modeling of biological regulatory networks: A methodology tutorial. **Methods**, v. 62, n. 1, p. 3–12, 2013.
- SANTOS, R. X.; BRENDDEL, M.; PUNGARTNIK, C. Carbon source-dependent variation of acquired mutagen resistance of *Moniliophthora perniciosa* : Similarities in natural and artificial systems. v. 45, p. 851–860, 2008.
- SATO, T. et al. The inference of protein-protein interactions by co-evolutionary analysis is improved by excluding the information about the phylogenetic relationships. **Bioinformatics**, v. 21, n. 17, p. 3482–3489, 2005.
- SAUER U., H. M.; ZAMBONI, N. Getting Closer to the Whole Picture. **Science**, v. 316, n. 5824, p. 550–551, 2007.
- SCARPARI, L. M. et al. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. v. 56, n. 413, p. 865–877, 2005.
- SCHMELZLE, T.; HALL, M. N. TOR, a central controller of cell growth. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 253–262, 2000.
- SCHMIDT, A.; SCHMELZLE, T.; HALL, M. N. The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1433–1441, 2002.
- SCHWEIZER, M. et al. The pentafunctional FAS1 gene of yeast: its nucleotide sequence and order of the catalytic domains. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 203, n. 3, p. 479–486, 1986.
- SCOTT, J. **Social network analysis: A handbook** SAGE Publications, 2000. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Social+Network+Analysis+A+Handbook#6>>
- SENA, K.; ALEMANN, L.; GRAMACHO, K. P. The infection process of *Moniliophthora perniciosa* in cacao. **Plant Pathology**, v. 63, n. 6, p. 1272–1281, 2014a.
- SENA, K.; ALEMANN, L.; GRAMACHO, K. P. The infection process of *Moniliophthora perniciosa* in cacao. **Plant Pathology**, 2014b.
- SHENG ZHAO; FERNALD, R. D. Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. v. 12, n. 8, p. 1047–1064, 2009.

SHERTZ, C. A et al. Conservation, duplication, and loss of the Tor signaling pathway in the fungal kingdom. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 510, 2010.

SHIN, K. S. et al. Differential roles of the chib chitinase in autolysis and cell death of aspergillus nidulans. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 5, p. 738–746, 2009.

SHOJI, J. YA; KIKUMA, T.; KITAMOTO, K. Vesicle trafficking, organelle functions, and unconventional secretion in fungal physiology and pathogenicity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 20, p. 1–9, 2014.

SILVA, F. A. C. et al. Proteomic response of Moniliophthora perniciosa exposed to pathogenesis-related protein-10 from Theobroma cacao. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4855–4868, 2013.

SKRABANEK, L. et al. Computational prediction of protein-protein interactions. **Molecular Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 1–17, 2008.

SREENIVASAN, T. N.; DABYDEEN, S. **Modes of Penetration of Young Cocoa Leaves by Crinipellis perniciosa.**, 1978.

STEINBERG, G.; PEREZ-MARTIN, J. Ustilago maydis, a new fungal model system for cell biology. **Trends in Cell Biology**, v. 18, n. 2, p. 61–67, 2008.

SUDBERY. Regulation of polarised growth in fungi. **fungal biology reviews**, v. 22, p. 44–55, 2008.

SZKLARCZYK, D. et al. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D447–D452, 2015.

TAPON, N.; HALL, A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 1, p. 86–92, 1997.

TEIXEIRA, P. J. P. L. et al. High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between Theobroma cacao and the fungal pathogen Moniliophthora perniciosa. **Plant Cell**, v. 26, n. 11, p. 4245–4269, 2014.

THOMAZELLA. The hemibiotrophic cacao pathogen Moniliophthora perniciosa depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development ´. p. 1025–1034, 2012.

VALDIVIESO, M. H. et al. Chitin synthesis in a gas1 mutant of Saccharomyces cerevisiae. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 17, p. 4752–4757, 2000.

VILLELA-DIAS, C. et al. Nep1-like protein from Moniliophthora perniciosa induces a rapid proteome and metabolome reprogramming in cells of Nicotiana benthamiana. **Physiologia Plantarum**, v. 150, n. 1, p. 1–17, 2014.

VON MERING, C. et al. STRING: Known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. DATABASE ISS., p. 433–437, 2005.

WANG, Y. et al. AIM: A comprehensive Arabidopsis interactome module database and related interologs in plants. **Database**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

WEBER, M. et al. Ectopic expression of a constitutively active Cdc42 small GTPase alters the morphology of haploid and dikaryotic hyphae in the filamentous homobasidiomycete

- Schizophyllum commune. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 7, p. 624–637, 2005.
- WILSON, R. A. et al. Towards Defining Nutrient Conditions Encountered by the Rice Blast Fungus during Host Infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–9, 2012.
- WULLSCHLEGER, S. et al. Molecular organization of target of rapamycin complex 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 35, p. 30697–30704, 2005.
- XENARIOS, I. DIP, the Database of Interacting Proteins: a research tool for studying cellular networks of protein interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 303–305, 2002.
- XIWEI ZHENG, CONG BI, MARISSA BROOKS, AND D. S. H. Sphingolipid Signaling in Fungal Pathogens. **Anal Chem.**, v. 25, n. 4, p. 368–379, 2015.
- XU, K. et al. Path lengths in protein-protein interaction networks and biological complexity. **Proteomics**, v. 11, n. 10, p. 1857–1867, 2011.
- YAMAUCHI, N. et al. Chlorophyll degradation in Wase satsuma mandarin (Citrus unshiu Marc.) fruit with on-tree maturation and ethylene treatment. **Scientia Horticulturae**, v. 71, n. 1–2, p. 35–42, nov. 1997.
- YAN, G.; LAI, Y.; JIANG, Y. The TOR Complex 1 Is a Direct Target of Rho1 GTPase. **Molecular Cell**, v. 45, n. 6, p. 743–753, 2012.
- YU, H. et al. Annotation Transfer Between Genomes : Protein – Protein Interologs and Protein – DNA Regulogs. **Genome Research**, p. 1107–1118, 2004.
- YU, H. et al. The importance of bottlenecks in protein networks: Correlation with gene essentiality and expression dynamics. **PLoS Computational Biology**, v. 3, n. 4, p. 713–720, 2007.
- ZHANG, F. et al. Genome-wide inference of protein interaction network and its application to the study of crosstalk in Arabidopsis abscisic acid signaling. **Plant Physiology**, v. 171, n. June, p. pp.00057.2016, 2016.

4 CAPÍTULO II

MpNet: mapa de interólogos para seleção de proteínas alvo para o controle da vassoura-de-bruxa

Edson Mario de Andrade Silva^a, Gabriel Gomes^b, Caio Suzart Argolo^a, Ceslaine Barbosa^a,
 Karina Peres Gramacho^c, Luciano Bernardes^b, Tiago Antonio de Oliveira Mendes^d, Fabienne
 Micheli^{a,e,*}

^aUniversidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Departamento de Ciências Biológicas (DCB), Centro de Biotecnologia e Genética (CBG), Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, 45662-900 Ilhéus-BA, Brazil.

^bUniversidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas (DCET), Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, 45662-900 Ilhéus-BA, Brazil.

^bCocoa Research Center, CEPLAC/CEPEC, Itabuna-BA, Brazil

^dUniversidade Federal de Viçosa (UFV)

^eCIRAD, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France

* Corresponding author. Fabienne Micheli, UESC, DCB, Rodovia Ilhéus-Itabuna km16, 45662-900, Ilhéus-BA, Brazil. Phone: +55 73 3680 5196. Fax: +55 73 3680 5226. E-mail: fabienne.micheli@cirad.fr

RESUMO

A doença vassoura-de-bruxa do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) é causada pelo fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*. Essa doença é responsável por uma queda da produção de amendoas e consequentemente na economia da indústria do chocolate. Essas perdas chegaram a 235 milhões de dólares ao ano e trouxeram uma grande crise para a cacauicultura em regiões produtoras da América Central e do Sul. A busca para o controle do desenvolvimento do fungo pode ser facilitada por estudos de biologia de sistemas que agregam estudos Ômicos (e.g. transcriptômica, proteômica, metabolômica) com estudos de redes biológicas. Aqui, nós implementamos estudos computacionais de mapa de interôlogos, com base no PEIMAP, PSIMAP, iPFAM e STRING, a partir dos quais predizemos um interatoma para

M. pernicioso associado com estudos de proteômica e transcriptômica do desenvolvimento de *M. pernicioso* em condições *in vivo* e *in vitro*. Obtemos o primeiro mapa de interólogo para *M. pernicioso*, chamado de MpNet, que agrega o volume de informação da maioria dos bancos de dados de interação proteína-proteína (IPP). MpNet se ajusta bem ao modelo de redes biológicas livre de escala, apresentando 1 405 proteínas e 6 699 conectores com alta confiança (*score* > 0.700). Módulos funcionais relacionados com processos biológicos de oxidação e redução, sinalização e metabolismo de proteínas se destacam nessa rede. A validação do mapa de interólogo realizada com dados de expressão genica relacionado com a formação da estrutura reprodutora e germinação de esporos chamam a atenção para proteínas centrais relacionadas com metabolismo de esfingolípídios no desenvolvimento do basidiocarpo. Por outro lado, processos relacionados com proteólise se destacam na germinação de esporos. Apresentamos aqui o MpNet que se mostra promissora para estudos relacionados com o desenvolvimento de *M. pernicioso*.

PALAVRAS CHAVES: *Moniliophthora pernicioso*, basidiomiceto, desenvolvimento, biologia de sistemas

INTRODUÇÃO

Moniliophthora (=Crinipellis) *perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005) é um fungo do grupo dos basidiomicetos, da ordem Agaricales. Esse patógeno é responsável por causar a doença vassoura-de-bruxa em plantas de cacau (*Theobroma cacao* L.); é uma das mais graves para o cacaueiro em países da América Central e do Sul (BRYAN A. BAILEY LYNDEL W. MEINHARDT, 2016; MEINHARDT et al., 2008). Estudos de biologia do desenvolvimento de *M. perniciosa* pode permitir entender seu ciclo de vida e revelar importantes pontos de controle da doença vassoura-de-bruxa. Nesse sentido, estudos mostraram que durante a infecção e colonização da planta, *M. perniciosa* que é um fungo hemibiotrófico, possui duas fases distintas, uma fase biotrófica (parasita) e uma necrotrófica (saprófita). Durante a fase biotrófica, *M. perniciosa* coloniza o apoplasto dos tecidos do cacau infectados e adota um tipo de nutrição parasítica; essa fase dura em torno de seis semanas e é caracterizada pela presença de hifas monocarióticas. Na segunda fase, as hifa se tornam dicarióticas e o fungo causa necrose e conseqüentemente morte nos tecidos infectados (MEINHARDT et al., 2008).

Estudos de biologia de sistemas, através de redes de interação proteína-proteína (IPP) obtidas *in silico*, vem sendo empregados de modo promissor na identificação de alvos para o controle de doenças. He e colaboradores (2008) identificaram alvos relacionados com o controle de fitopatógenos, como no fungo da brusone do arroz (HE et al., 2008). É também possível analisar a resposta da planta no sentido de selecionar genes candidatos para a resistência a estresse biótico (LIU et al., 2017). Em *Mycobacterium tuberculosis* e *Leishmania major*, as abordagens computacionais de redes IPP também foram aplicadas no sentido de identificar alvos para o controle de doenças causadas por esses patógenos, em humanos (CASCANTE et al., 2002; CUI et al., 2009; FLÓREZ et al., 2010; REZENDE et al., 2012). Ainda, muitos

trabalhos voltados para a compreensão da biologia de organismos como *Arabidopsis thaliana* e *Homo sapiens* empregam essa abordagem, demonstrando que interatômas preditos são alternativas eficazes para a busca de moléculas alvos (LIN et al., 2011; WANG et al., 2014; ZHANG et al., 2016).

Em *M. perniciosa*, estudos vêm utilizando redes IPP para compreensão do seu desenvolvimento. O principal método empregado baseia-se em mapa de interólogos (Interolog Mapping; FLÓREZ et al., 2010; KIM et al., 2008; REZENDE et al., 2012; YU et al., 2004). Esse mapa leva em consideração que se duas proteínas que interagem entre si em um organismo tem alta similaridade com outras duas proteínas em um segundo organismo; certamente essas últimas também interagirão entre si (KIM et al., 2008; YU et al., 2004). Porém, esses estudos têm utilizado apenas um organismo como modelo, fato que pode limitar o interatoma apenas aos homólogos existentes entre esses modelos e *M. perniciosa* (CARVALHO et al., 2013; MARES et al., 2016b). Assim foi observada a necessidade da criação de um interatoma de referência amplo para *M. perniciosa* tendo como modelo não apenas um organismo, mas empregando grandes bancos de dados, com milhares de modelos e milhões de IPP. Por isso, utilizamos os bancos de dados PEIMAP/DIP (XENARIOS, 2002); BIND (ISSERLIN; EL-BADRAWI; BADERY, 2011); IntAct (HERMJAKOB et al., 2004); MINT (LICATA et al., 2012); HPRD (KESHAVA PRASAD et al., 2009); BioGrid (CHATR-ARYAMONTRI et al., 2017); PSI-MAP (SCOP); iPfam e STRING. Esses bancos são grandes repositórios de redes de IPP, que chega a casa dos milhares de organismos e a centenas de milhões de pares de interações. Ao associarmos estudos de interatomica – através de análises de topologia de rede e módulos funcionais – a dados de expressão genica, foram identificados onze módulos de proteínas, bem como proteínas centrais de *M. perniciosa* durante sua interação com *T. cacao* no estágio de vassoura verde.

Assim, construímos o interatoma *M. perniciosa* (chamado de MpNet) que apresenta excelente ajuste ao modelo de redes biológicas livres de escala. Esse interatoma pode ser aplicada em estudos relacionados com variados aspectos do desenvolvimento de *M. perniciosa*. Dados de macroarranjo associados a MpNet, chamam a atenção para o metabolismo de esfingolipídios e possibilitaram a identificação de proteínas centrais dentro desse processo. MpNet foi aplicado ao estudo da germinação de esporos de *M. perniciosa* reforçando que grupos de proteínas relacionados com o síntese e degradação de proteínas são relevantes no processo de germinação. Temos como forte perspectiva o uso de MpNet no estudo da interação *M. perniciosa*-cacao, através da integração de dados de RNAseq da doença da vassoura-de-Bruixa.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Visão geral do estudo do interatoma de *M. perniciosa*

O interatoma para *Moniliophthora perniciosa* foi obtido com base nos trabalhos de Florez e colaboradores (2010) e Kim e colaboradores (2008). Nesse sentido, empregamos quatro diferentes métodos (PSIMAP, iPfam, PEIMAP e STRING), que se baseiam em análises de similaridade de sequências através de ferramentas como BLASTP (PEIMAP e STRING); PSI-BLAST (PSIMAP); “Modelos Ocultos de Markov” (*Hidden Markov Models* - HMM) (iPfam). Foram obtidos interatomas para *M. perniciosa* para todos os métodos seguido por união em um único interatoma. As etapas básicas envolveram: i. busca por similaridade entre as proteínas de *M. perniciosa*, de acordo com cada método e alinhamento local para obtenção da anotação GO no *UniProt Reference Clusters* (UniRef90) e *non-redundant protein* (nr); ii. obtenção do interatoma de *M. perniciosa* a partir dos resultados de similaridade e respectivos

arquivos de interação de cada método e obtenção do arquivo de anotação GO com o Blast2GO a partir dos resultados de alinhamentos vindos do Uniref90 e nr; iii. cálculo de confiança (*score*) para cada par de interação, de acordo com cada método e normalização (0-1) e obtenção do arquivo de anotação para *M. pernicioso*; iv. união dos arquivos de interação e cálculo do *score* combinado dos métodos utilizados e busca de dados de RNAseq da interação cacao-*M. pernicioso*; v. seleção de interações de alta confiança (>0.700) Mapeamento de *read* contra os transcritos preditos de *M. pernicioso*; vi. análises de rede (módulos, centralidades e ontologia genica). Os *scripts* utilizados nesse trabalho foram adaptados de trabalhos ainda não públicos (vide FIG. 1).

a. Protein Structural Interactome map (PSIMAP)

O algoritmo PSI-MAP utiliza PSI-BLAST para determinar pares de interação a partir da similaridade entre determinado par de *query* e pares de domínios que interagem entre si, disponíveis no *Structural Classification of Proteins* (PARK et al., 2005). Nós utilizamos como *query* as proteínas preditas de um novo sequenciamento do biótipo C de *Moniliophthora pernicioso* (Mp4145) (http://nbcgib.uesc.br/emandrade/Mp4145_prot.txt.txt). O ponto de corte para o *E-value* foi de < 0.0001. Os Ids dos alinhamento acima do ponto de corte para *E-value* foram utilizados para separar um arquivo de IPP que contém o *score* para a interação. As IPPs com base no algoritmo PSI-MAP levam em conta a distância atômica entre domínios dentro do complexo, por tanto, falamos de interação física entre proteínas. O PSI-MAP, pontua as interações a partir de um *score* e leva em conta essa distância atômica entre os domínios, disponíveis no PDB (*Protein Data Bank*).

a. iPfam

Também realizamos um estudo de interações com base nos domínios do iPfam utilizando as proteínas preditas de Mp4145 como *Query* contra o Pfam (FINN et al., 2014). O iPfam cataloga interações de domínio Pfam baseadas em estruturas 3D conhecidas que são encontradas no *Protein Data Base* (PDB), fornecendo dados de interação ao nível molecular (FINN et al., 2014). A busca por similaridade dos domínios foi realizada utilizando o algoritmo de Cadeias Ocultas de Markov (HMM, do inglês *Hidden Markov Model*), com corte para *E-value* de 0.01. As proteínas que apresentaram valores acima do ponto de corte para *E-value* foram selecionadas para a obtenção do interatoma a partir do iPfam. O score de confiabilidade do iPfam foi obtido a partir do score entre dois domínios do Pfam que interagem segundo o arquivo de interação do iPfam database. A partir dos valores de confiabilidade foi realizado de acordo com a seguinte fórmula:

$$Score = \sum (b1 + b2)$$

onde *b1* é o *bitscore* do alinhamento da proteína 1 de *M. perniciosus* com o domínio A no Pfam e *b2* é o *bitscore* do alinhamento da proteína 2 com o domínio B que interage com o domínio A.

b. Algoritmo *Protein Experimental Interactome* MAP (PEIMAP)

O PEIMAP é um algoritmo que se baseia em similaridade de sequência por BLASTP. Essa ferramenta agrupa informações de grandes repositórios de informação de IPP com base experimental (DIP, BIND, IntAct, MINT, HPRD e BioGrid), sendo uma importante ferramenta para a determinação de interatomas. O valor de reabilidade do PSIMAP utiliza os valores de distância entre um par de domínio que interagem entre si (SCOP). Nesse sentido, realizamos um BLASTP utilizando as proteínas preditas de Mp4145 contra o banco do PEIMAP, tendo

como ponto de corte alinhamentos com identidade $\geq 70\%$ e $E\text{-value} < 10^{-10}$. O score utilizado no PEIMAP é dado de acordo com a confiabilidade do método empregado para determinar a interação entre determinado par de interação. Existem métodos mais confiáveis que outros e um par de interação pode ser validado por diferentes métodos. Assim, o cálculo do score de confiabilidade PEIMAP foi realizado de acordo com Flórez e colaboradores (2010), e leva em conta a confiabilidade do par de interação em cada método. Desse modo, o *score* para determinado par de IPP é definido como:

$$Score = \sum (R_{A \leftrightarrow B})$$

Onde $R_{A \leftrightarrow B}$ corresponde a confiabilidade (R) do par de interação $A \leftrightarrow B$.

c. STRING

O STRING *database* é um dos maiores repositórios de IPP, contando com um total de 9.6 milhões de proteínas com interações físicas e funcionais para mais de 2 000 organismos (SZKLARCZYK et al., 2015). Realizamos o BLASTP das proteínas preditas de Mp4145 contra o STRING, utilizando como ponto de corte identidade $\geq 70\%$ e $E\text{-value} < 10^{-10}$. Visto que o STRING *database* possui milhares de organismos, teremos milhares de pares de interação homóloga em *M. perniciosus*. Assim, a confiança de um determinado par de interação para *M. perniciosus* é dada pelo somatório do score combinado de todos os pares de interação homóloga encontradas no STRING *database* sendo definida como

$$Score = \sum (score_{A \leftrightarrow B})$$

onde $A \leftrightarrow B$ equivale ao par de interação entre a proteína A e B, que apresenta um score combinada entre todos os métodos utilizados pelo STRING *database*.

d. Calculando o score final das interações

O score final dado para as interações considera o *score* (confiabilidade) para todos os métodos calculados até aqui. Nesse sentido, foi calculado o *score* combinado a partir do *score* de todos os métodos segundo Flórez e colaboradores (2010):

$$score = 1 - \prod_{i \in E} (1 - R_i)^n$$

onde E deve corresponder ao conjunto de métodos utilizados (STRING, iPfam, PEIMAP, PSIMAP); R_i é a confiabilidade do método i ; n se refere ao número de interações determinada pelo método i . O *score* combinado foi normalizado numa escala entre 0-1 e selecionamos para o interatoma de *M. perniciosus* apenas as interações com alta confiança ($\geq 0,7$).

2. Estudo do interatoma de *M. perniciosus*

Redes biológicas apresentam propriedades específicas. Elas seguem uma Lei de Potência (*Power Law*) ($P(k) \sim K^{-\gamma}$) e são consideradas livre de escala, possuindo poucos nós muito conectados e muitos nós poucos conectados. Para avaliar o ajuste da rede de *M. perniciosus* foi utilizado o pacote *Igraph* do programa R (CSÁRDI; NEPUSZ, 2006). Análises de topologia de rede foram realizadas para estudar o grau (*degree*) e intermediação (*betweenness*) dos nós, utilizando a biblioteca *Igraph* em ambiente R (<https://cran.r-project.org/>). A centralidade *Betweenness* ($C_b = (n)$) de um vertice $\{v\}$ é definido por:

$$C_b(n) = \sum_{s \neq n \neq t} (\delta_{st}(n) / \delta_{st})$$

onde s e t são nós na rede diferentes de n . δ_s indica o número de caminhos mais curtos de s para t , e $\delta(n)$ é o número de caminhos mais curtos de s para t que se encontram em n .

2.1. Estudo de módulos funcionais

2.1.1 Análises de módulos

Realizamos um estudo para identificar regiões da rede de *M. perniciosus* que se dividem em subgrupos densamente conectados entre si (clusters, módulos ou comunidades). Para isso um algoritmo baseado em *greedy optimization of the quantity* (modularidade) (BADER; HOGUE, 2003; CLAUSET; NEWMAN; MOORE, 2004; NEWMAN, 2003) foi utilizado para identificar módulos. Para isso, a rede obtida foi analisada em ambiente R, com a função *graph.data.frame* para redes não direcionada (*directed = FALSE*) e em seguida foi realizada a análise de módulos com a função *fastgreedy.community* (NEWMAN, 2003) no pacote *Igraph*. Os módulos mais populosos foram selecionados.

2.1.2. Anotação das proteínas preditas por categorias do *Gene Ontology* (GO)

Realizamos a anotação para as 13 939 proteínas preditas de *M. perniciosus*, utilizando Blastp, segundo o algoritmo do DIAMOND. O DIAMOND é um programa de alto rendimento para alinhar sequências de DNA ou sequências de proteínas contra um banco de dados de referência de proteínas, como nr (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/about/nonredundantproteins/>), até 20 000 vezes a velocidade do BLAST, com alta sensibilidade (BUCHFINK; XIE; HUSON, 2014). Realizamos um blastp com DIAMOND montando os bancos UniRef90 e nr localmente e o blastp foi procedido com as opções “*--id 50 --window 6 --max-target-seqs 20 --more-sensitive --gapopen 11 --gapextend 1 --threads 12 --outfmt 5*”. Utilizamos as sequências do UniRef90 e o bando de proteínas não redundantes (nr) do ncbi como *subject*. O *xml* gerado pelo DIAMOND foi direcionado para o Blast2GO para realizar a anotação de referência (CONESA et al., 2005).

Uma análise de enriquecimento dos processos biológicos de cada módulo foi realizada com a ferramenta *Biological Networks Gene Ontology tool* (BiNGO) (MAERE; HEYMANS; KUIPER, 2005), tendo como referência, a anotação funcional realizada no DIAMOND e Blast2GO. Para isso foi utilizada a distribuição hipergeométrica (RIVALS et al., 2007) com correção para comparações múltiplas usando Benjamini & Hochberg *False Discovery Rate* (FDR), com um nível de significância (p) < 0,05 (BENJAMINI et al., 2001; BENJAMINI; HOCHBERG, 1995; GOMES et al., 2016).

2. Biologia de sistemas de *Moniliophthora perniciosa* durante o seu desenvolvimento e na sua interação com *Theobroma cacao*: validação

Utilizamos dados de sequenciamento de Illumina HiSeq 2000 de cinco réplicas de plantas de cacau infectadas por *M. perniciosa* (fase biotrófica/vassoura-verde) disponíveis em <https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJNA189464> (Material suplementar; TEIXEIRA et al., 2014). Essas *reads*, no formato *fastq*, foram utilizadas para realizar alinhamento contra as *CDSs* (*CoDing Sequence*) preditas a partir de um novo sequenciamento, não publicado, do biótipo C de *M. perniciosa* (CEPLAC/CEPEC, Bahia, Brasil accession number 4145) (http://nbcgib.uesc.br/emandrade/Mp4145_CDS.txt.txt). O mapeamento para sequenciamento *paired-end* foi realizado com o Bowtie2 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012) e a contagem das *reads* foi realizada de acordo (BUSHNELL, 2014) com os padrões *phred33* (qualidade phred 33), *no-unal* (suprimir registros SAM para leituras desalinhadas), *threads 8* (número de processadores utilizados) e *reads* pareadas (sequenciamento *paired-end*).

Também foram utilizados dados de macroarranjo que destaca importantes genes relacionados com o desenvolvimento do corpo de frutificação de *M. perniciosa* (PIRES et al., 2009). Dados de proteômica relacionados a germinação de esporos de *M. perniciosa* também foram associados ao interatoma de *M. perniciosa* (MARES et al., 2016b).

RESULTADOS

1. Interatoma

Nós utilizamos quatro bancos de dados (PEIMAP, STRING, PSIMAP e iPFAM) que se baseiam em diferentes métodos para determinar a IPP. A partir do PEIMAP identificamos 218 interações; no iPFAM, identificamos 5 824 interações; no PSIMAP, 9 602 e no STRING, identificamos 9 601 interações (FIG. 2). Dentre essas interações 84 delas são compartilhadas entre todos os bancos, 13 foram exclusivas do PEIMAP e 1 501 do iPFAM (FIG. 2). Os PSIMAP e STRING possuem apenas uma interação que não pertence ao STRING, as demais são compartilhadas entre esses dois bancos. O *score* de confiança para um par de interação é avaliado em uma escala entre 0-1. Os dados gerados a partir dos quatro bancos de dados possibilitaram obter um interatoma para *M. perniciosus* com um total de 1 405 proteínas e 6 699 conectores com alta confiança (*score* > 0.700) (FIG. 1-A) (http://nbcgib.uesc.br/emandrade/MpNet_700.txt.txt). A avaliação do ajuste ao modelo livre de escala mostrou que o interatoma de *M. perniciosus* está bem ajustado a essa topologia (FIG. 1-B).

2. Ontologia Gênica

As análises para gerar o arquivo de anotação de termos GO para *M. perniciosus* (FIG.1) foram realizadas a partir de alinhamento local proteína-proteína, com o DIAMOD, contra os bancos UniRef90 e Nr. Os resultados desses alinhamentos foram anotados pelo Blast2GO. A partir do UniRef90, conseguimos 50 973 termos GO para 9 654 proteínas, e a partir do Nr foram obtidos 22 906 termos GO para um total de 3 313 proteínas. A união desses arquivos (FIG. 1) gerou um arquivo de anotação de termos GO para *M. perniciosus*, com um total de 63504 termos

para 10123 proteínas (http://nbcgib.uesc.br/emandrade/Mp_GoSlim.txt.txt), ou seja 72,6% das 13939 proteínas anotadas de *M. pernicioso*.

3. Centralidade

Realizamos estudos para avaliar o valor de k e o valor de intermediação ($C_b(n)$) para cada proteína da rede (FIG. 4). A rede possui valor $\langle k \rangle = 9.56$ e $\langle C_b \rangle = 2911.21$. Classificamos proteínas *hub* (H), *bottleneck* (B), *hub-bottleneck* (HB) e comuns (C) (FIG. 4). Dentre as proteínas com valores acima daquelas médias, selecionamos 34 proteínas que mais se destacaram do gráfico *betweenness~degree* (FIG. 4). Quando associamos essas informações à análise de enriquecimento funcional dos módulos, conseguimos separar as proteínas mais relevantes dentro de cada módulo funcional. Destacamos essas proteínas com diferentes cores (FIG. 4)

.

3.1. Módulos e análise de enriquecimento funcional

A partir da rede de IPP de *M. pernicioso*, foi possível identificar dez módulos que destacaram em relação ao número de nós e por fazerem parte da rede principal e estão destacados em diferentes cores (FIG. 3). Dentre as 1405 proteínas identificadas no interatoma de *M. pernicioso*, 1129 foram agrupadas em um desses módulos. Os dados da anotação GO das proteínas preditas, possibilitou a realização do enriquecimento funcional dos módulos identificados e possibilitou caracterizar grupos de proteínas com diversos processos biológicos com os menores *p-value* ajustados e processos que se destacam por estarem relacionado com desenvolvimento ou reprodução de *M. pernicioso* (FIG. 3). Uma lista com essas proteínas suas respectivas funções esta apresentada na Tabela 1.

4. Desenvolvimento de *M. pernicioso* e interação cacau-*M. pernicioso*

Identificamos proteínas centrais para o processo de formação do basidiocarpo em *M. pernicioso*, desenvolvimento de esporos e pretendemos selecionar proteínas centrais para envolvidos no estágio biotófico durante a interação cacau-*M. pernicioso*.

DISCUSSÃO

1. *Moniliophthora perniciosa* e seu interatoma

Moniliophthora perniciosa é um fungo hemibiotrófico, portanto, durante seu desenvolvimento com seu hospedeiro ele apresenta uma fase na qual seu estilo de vida é biotrófico e uma segunda fase que é necrotrófica. Na fase biotrófica da vassoura-de-bruxa o fungo possui hifas monocarióticas e coloniza o apoplasto do hospedeiro; ele se nutre de compostos sintetizados pela planta, sendo portanto uma fase parasítica. Na medida que a doença progride e de acordo com as respostas do hospedeiro espécies reativas de oxigênio tendem a ser produzidas numa “tentativa” de defesa e contenção do patógeno (MEINHARDT et al., 2008; THOMAZELLA, 2012; VILLELA-DIAS et al., 2014). Devido a toda a condição altamente oxidativa, a fisiologia de *M. perniciosa* muda de modo a levar a doença para o estágio de vassoura-seca, na qual o fungo assume um estilo de vida necrotrófico, passando e colonizar o espaço intracelular e levando o tecido a morte (BRYAN A. BAILEY LYNDEL W. MEINHARDT, 2016; MEINHARDT et al., 2008). Nesse momento o fungo se nutre dos recursos originados da degradação das estruturas celulares da planta. O próximo passo dessa interação é a formação do basidiocarpo e dos basidiosporos, que é a única forma que *M. perniciosa* utiliza para produzir esporos. Ao entrar em contato com o hospedeiro, os esporos germinam e tendem a penetrar o hospedeiro através da base de tricomas e aberturas naturais (SENA; ALEMANNIO; GRAMACHO, 2014b). Esses basidiósporos infectam tecidos meristemáticos, como frutos, meristemas apicais, brotos e almofadas florais (SENA; ALEMANNIO; GRAMACHO, 2014b). Assim, temos todo o ciclo de *M. perniciosa* no sistema *in vivo*. Porém, estudos experimentais votados para Ômicas (e.g. transcriptômica, proteômica, metabolômica) são limitados nesse sistema, dando margem para os estudos *in vitro* que são a base para estudos de biomoléculas.

Nossa base em biologia de sistemas abre portas para selecionar proteínas importantes para diversos processos, que vão desde o desenvolvimento da estrutura reprodutora, desenvolvimento do esporos, até estudo da interação do fungo com o cacaueiro. Esse último se faz viável através de dados de alto rendimento de transcritos (*highthrouput*) em plataformas como HiSeq, que possibilitam alcançar centenas de milhares de *reads* e assim identificar transcritos do patógeno em meio a enorme quantidade de transcritos do hospedeiro. Conseguimos obter dados públicos de expressão genica tanto da interação biotrófica da vassoura-de-bruxa através de RNA-seq em plataforma HiSeq que são públicos e disponíveis (TEIXEIRA et al., 2014). Os dados já foram alinhados aos transcritos preditos e ressaltamos aqui como perspectiva a contagem de reads por transcritos e associação desse resultado ao interatoma. Por outro lado associamos à rede dados de expressão por macroarranjo, do estudo de formação do basidiocarpo em *M. pernicioso* (PIRES et al., 2009). Ainda, dados de proteômica da germinação de esporos de *M. pernicioso* também foram encontrados (MARES et al., 2016a). Esses dados possibilitaram validar a consistência do interatoma de *M. pernicioso* para estudos relacionados tanto com o desenvolvimento *in vitro*, como *in vivo*.

Embora o método tenha base em similaridade, as diferentes fontes de interações (experimentais-interação física, domínios, distância atômica) podem possibilitar a seleção de interações que vão além daquelas encontradas. A rede de *M. pernicioso* segue o modelo livre de escala, sendo adequada para explicar fenômenos biológicos. O valor de R^2 que encontramos para a nossa rede (0.811) nos permite ter alta confiança nas inferências que fazemos nesse trabalho, em relação ao ajuste ao modelo biológico de redes (REZENDE, 2012). Quando comparamos as previsões dos módulos funcionais com estudos experimentais do desenvolvimento de *M. pernicioso* (FIG. 3 e FIG. 4) reafirmamos a consistência da rede de *M. pernicioso*.

2. Desenvolvimento e reprodução

2.1 Basidiocarpo

Basidiomicetos da ordem Agaricales, como *M. perniciosus* desenvolvem estruturas aéreas do tipo basidiocarpo, que é considerado o órgão reprodutor desses fungos. É conhecido que a formação de basidiocarpos em *M. perniciosus* é precedida por condição de seca (GOMES et al., 2016; PIRES et al., 2009; PURDY; DICKSTEIN, 1990; PURDY; SCHMIDT, 1996). Basidiocarpos de *M. perniciosus* são obtidos tanto no sistema *in vivo*, como *in vitro* (em bolachas), no qual o fungo apresenta hifas dicarióticas e o estágio monocariótico não é muito evidente. Durante o seu desenvolvimento nesse meio, o micélio de *M. perniciosus* apresenta seis fases bem características, sendo quatro iniciais de desenvolvimento micelial e duas fases de desenvolvimento do basidiocarpo. O desenvolvimento micelial é dicariótico e é separado do desenvolvimento da estrutura reprodutora, por um período de seca, que tende a levar o fungo a emitir o corpo de frutificação após reidratação (GOMES et al., 2016; PIRES et al., 2009; PURDY; DICKSTEIN, 1990).

Por outro lado Pungartnik e colaboradores (2009) colocam em evidência a importância de fenômenos oxidativos e autofágico para a sobrevivência e diferenciação das hifas em *M. perniciosus*. No sistema *in vivo*, o estresse oxidativo tende a gerar morte celular do hospedeiro e mudanças na fisiologia do fungo levando a doença para o estágio de vassoura seca na qual *M. perniciosus* apresenta hifas dicarióticas e estilo de nutrição necrotrófico. Esse é o ambiente no qual *M. perniciosus* se encontra antes da formação do basidiocarpo. Nesse sentido, acreditamos que esse fungo possui um forte aparato molecular para lidar com a condição de estresse e progressão do seu ciclo de vida (PUNGARTNIK et al., 2009a).

Três módulos relacionados com oxidação e redução foram encontrados na rede de *M. perniciosus*, chamando a atenção para o grande volume de informação relacionado com resposta a oxidação (FIG. 3-A). A eficiência desse fungo para lidar com estresse é um fator marcante para seu sucesso no decorrer da interação com o hospedeiro. sca29.4.1, sca12.20.1 e sca3.158.1 participam desses módulos e estão relacionadas como oxidação e redução e se destacam por conterem proteínas provavelmente relacionadas com o desenvolvimento do primórdio em *M. perniciosus*. sca29.4.1 se destaca como uma proteína com domínios relacionados com a síntese de longas cadeias de ácidos graxos e identificada como um *hub-bottleneck* na rede, apontando para o uma proteína que faz muitas interações e apresenta valor de intermediação muito acima da média (103 068) (FIG. 4) fato que a destaca como uma das proteínas mais importantes dentro da rede a nível de regulação (YU et al., 2007). Esse papel central é reforçado quando consideramos que sca.29.4.1 tem alta similaridade com FAS1 de *S. cerevisiae*, que é a subunidade beta da ácido graxo sintetase (SCHWEIZER et al., 1986). FAS1 em *Cryptococcus neoformans* tem sido considerado um alvo para o controle desse fungo (IANIRI; INDRUM, 2015). Estando 1,4 vezes mais expresso no primórdio de *M. perniciosus* que na fase inicial (branca). O aumento de expressão de genes relacionados com o metabolismo de ácidos graxos no primórdio, pode estar relacionado com o elevado teor lipídico de hifas e esporos do basidiocarpo (BORGES, 2008; Powell and Strange; 1953 Strange and Dark, 1957; Leighton and Stock, 1969).

sca3.158.1 é uma aldeído desidrogenase, encontrado na membrana mitocondrial envolvida na síntese de esfingolipídios. Esses compostos participam da constituição de membranas celulares e são importantes fatores de regulação da patogenicidade em fungos, participando de vias de sinalização (ROLLIN-PINHEIRO et al., 2016; XIWEI ZHENG, CONG BI, MARISSA BROOKS, 2015). O papel de gargalo desse nó chama a atenção, por ter valor

de intermediação milhares de vezes acima da média (122423) (FIG. 4) e corrobora a função de proteínas gargalos como reguladoras dentro dos sistemas biológicos, sendo ainda mais importantes como alvos para o controle de doenças como alvo de drogas, do que aquelas que são consideradas *hub* (ABBASI; HOSSAIN; LEYDESDORFF, 2012b; YU et al., 2007).

A formação do corpo de frutificação de *M. perniciosus* ocorre após eventos relacionados com reciclagem de nutrientes, autofagia, dentre outros processos que culminam num intenso rearranjo de hifas (GOMES et al., 2016; PIRES et al., 2009). Nesse contexto, processos relacionados com *turnover* de biomoléculas, como proteínas devem ser determinante para o sucesso do desenvolvimento e mudanças anatômicas que ocorre nessa fase. O proteassoma é o principal complexo relacionado com a reciclagem de proteínas dentro da célula e proteínas que marcam outras proteínas para serem direcionadas para o proteassoma (ubiquitinas). Ubiquitinas como UBI4 em *S. cerevisiae* vem sendo relatadas como determinantes para o desenvolvimento de esporos causando deficiência no processo de esporulação, em fenótipo com esporulação defeituosa (NEIMAN, 2005). sca28.64.1 é uma poliubiquitina que tem grande similaridade com UBI4 de *S. cerevisiae* e está localizada no principal cluster no qual a função biológica relacionada com reprodução sexual foi encontrada (FIG. 3). Além disso, sca28.64.1, é um hub-bottleneck (FIG. 4), que é uma característica importante para uma proteína do tipo ubiquitina.

Dentre outras proteínas, também encontradas no módulo relacionado com desenvolvimento anatômico e reprodução, identificamos sca19.46.1, sca26.26.1, sca93.24.1, sca393.6.1, sca20.61.1 (Tabela 1-ClusterA). Embora essas proteínas não tenham sido identificadas em nenhum dos experimentos agregados a esse trabalho, elas se destacam por serem fortes candidatos relacionados com a reprodução em *M. perniciosus* e para validar a importância do interatoma aqui proposto.

2.2 Germinação de Esporos

Os basidiósporos são as células haploides (n) originadas da reprodução sexuada entre hifas + e hifas -, após a formação da estrutura reprodutora em *M. pernicioso*. Processos de proteólise e catabolismo de lipídios são considerados determinantes para o processo de germinação de esporos (POWELL; STRANGE, 1953). Considerando que o primeiro contato do fungo com o seu hospedeiro é através de esporos, avaliar o interatoma no sentido de identificar alvos relacionados com o a germinação de esporos é determinante para entender os mecanismos envolvidos com esse fenômeno. Mares e colaboradores (2016) avaliaram o processo de germinação de esporos em diferentes tempos que apresentam representantes dentro de MpNet. Estudos do perfil proteômico de espóros de fungos filamentosos apresentam maior nível de expressão de genes relacionados com o metabolismo energético, como carboidratos lipídios e proteínas (EL-AKHAL et al., 2013; NOIR et al., 2009; OH et al., 2010). Já foi destacado acima uma importante proteína relacionada com o metabolismo de lipídios provavelmente na síntese de lipídio na fase de produção de estruturas reprodutoras. sca18.47.1, sca3.140.1, sca31.7.1, sca70.20.1, sca18.62.1 e sca30.51.1 (Ribosomal protein S3) são foram encontrados nos dados relacionados com a germinação do esporo de *M. pernicioso*, apontando para uma intensa atividade da maquinaria de síntese proteica (MARES et al., 2016a, 2017).

CONCLUSÃO

O interatoma MpNet apresenta um conjunto de proteínas que demonstra a eficiência dos métodos aqui utilizados. Essa rede apresenta padrões coerentes com modelos biológicos livre de escala, no qual poucas proteínas fazem muitas conexões. MpNet possui grande volume de proteínas identificadas em experimentos relacionados com o desenvolvimento do corpo de frutificação e germinação de esporos foi também identificado na rede, mostrando que nosso trabalho pode dar suporte a outros estudos relacionados com *M. perniciosa*. Esse fato mostra que o interatoma obtido nesse trabalho pode ser empregado em outros estudos, de modo a permitir maior esclarecimento das interações proteicas e do sistema como um todo. O metabolismo de lipídios como os esfingolipídios não tem recebido a devida atenção em *M. perniciosa*. MpNet aponta para proteínas importantes dentro desse processo e que podem ser alvos para o controle da vassoura-de-bruxa. Ainda, temos como perspectiva o estudo do sistema, voltado para a interação de *M. perniciosa* durante sua interação com *T. cacao* na fase biotrófica, que permitirá selecionar proteínas centrais que atuam nesse estágio da doença.

REFERÊNCIA

- ABBASI, A.; HOSSAIN, L.; LEYDESDORFF, L. Betweenness centrality as a driver of preferential attachment in the evolution of research collaboration networks. **Journal of Informetrics**, v. 6, n. 3, p. 403–412, 2012a.
- ABBASI, A.; HOSSAIN, L.; LEYDESDORFF, L. Betweenness centrality as a driver of preferential attachment in the evolution of research collaboration networks. **Journal of Informetrics**, v. 6, n. 3, p. 403–412, 2012b.
- ADAMI, A. et al. Structure of TOR and Its Complex with KOG1. **Molecular Cell**, v. 27, n. 3, p. 509–516, 2007.
- AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v. 97, n. 5, p. 1012–1022, 1 set. 2005.

ALBERT, R.; JEONG, H.; BARABÁSI, A.-L. Error and attack tolerance of complex networks. **Nature**, v. 406, n. 6794, p. 378–382, 27 jul. 2000.

ARGÔLO SANTOS CARVALHO, H. et al. Polygalacturonases from *Moniliophthora perniciosa* are regulated by fermentable carbon sources and possible post-translational modifications. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 60, p. 110–21, nov. 2013.

BADER, G. D.; HOGUE, C. W. V. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. **BMC Bioinformatics**, v. 4, n. 1, p. 2, 2003.

BARABÁSI, A.-L. Network science: the Barabási-albert model. **Network Science**, 2015.

BARABÁSI, A.-L. The Scale-Free Property. **Network Science**, p. 474 pages, 2016.

BARABÁSI, A.-L.; ALBERT, R. Emergence of Scaling in Random Networks. **Science**, v. 286, n. October, p. 509–512, 1999.

BARABASI, A. L.; OLTVAI, Z. N. Network Biology: Understanding the Cell's Functional Organization. **Nature Review**, v. 5, n. February, p. 101–113, 2004.

BASTOS, C N; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology**, n. 1981, p. 306–312, 1985.

BASTOS, C. N.; ANDEBRHAN, T. In vitro production of basidiospores of *Crinipellis perniciosa*, the causative agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, n. 3, p. 406–409, 1987.

BAVELAS, A. A Mathematical Model for Group Structures. **Human Organization**, v. 7, n. 3, p. 16–30, 1948.

BENJAMINI, Y. et al. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. **Behavioural brain research**, v. 125, n. 1–2, p. 279–84, 1 nov. 2001.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Source Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological) Journal of the Royal Statistical Society. Series BMethodological) J. R. Statist. Soc. B**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 14 nov. 1995.

BICKLE, M. et al. Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. **EMBO Journal**, v. 17, n. 8, p. 2235–2245, 1998.

BÖLKER, M. *Ustilago maydis* - A valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. **Microbiology**, v. 147, n. 6, p. 1395–1401, 2001.

BONATTO, D.; NAKAYA, H. T. I. Genômica e Biologia de Sistemas. In: INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (Ed.). . **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações**. Cambridge: Cambridge University Press, 2016. v. 1p. 227–302.

BORGES, A. C. Total Lipid and Fatty Acid Accumulation During Basidiospore Formation in

the Ectomycorrhizal. n. 1, p. 1531–1540, 2008.

BORKOVICH, KATHERINE A. EBBOLE, D. J. Cellular and molecular biology of filamentous fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 157–158, jan. 2010a.

BORKOVICH, KATHERINE A. EBBOLE, D. J. Filamentous Fungi. **American Society for Microbiology Press**, v. 9, n. 2, p. 157–158, jan. 2010b.

BOTSTEIN, D.; CHERVITZ, S. A.; CHERRY, J. M. Yeast as a model organism. **Science (New York, N.Y.)**, v. 277, n. 5330, p. 1259–60, 29 ago. 1997.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, n. 8, p. 799–808, 2006.

BOYCE, K. J.; A., A. **Morphogenesis: Control of Cell Types and Shape**. [s.l: s.n.].

BRANDES, U. A faster algorithm for betweenness centrality*. **The Journal of Mathematical Sociology**, v. 25, n. 2, p. 163–177, 2001.

BRANDES, U.; ERLEBACH, T. **Network Analysis: Methodological Foundations**. [s.l: s.n.]. v. 3418

BREITLING, R. What is systems biology? **Frontiers in Physiology**, v. 1 MAY, n. May, p. 1–5, 2010.

BRUN, L. A.; CORFF, J. LE; MAILLET, J. Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species. **Environmental Pollution**, v. 122, p. 361–368, 2003.

BRYAN A. BAILEY LYNDEL W. MEINHARDT. **Cocoa Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters**. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 101

BUCHFINK, B.; XIE, C.; HUSON, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p. 59–60, 2014.

BUSHNELL, B. BBMap : A Fast , Accurate , Splice-Aware Aligner. **LBNL Department of Energy Joint Genome Institute**, p. 3–5, 2014.

CARDON, C. M. et al. PAS Kinase Promotes Cell Survival and Growth Through Activation of Rho1. **Science Signaling**, v. 5, n. 209, p. ra9-ra9, 2012.

CASCANTE, M. et al. Metabolic control analysis in drug discovery and disease. **Metabolic control analysis in drug discovery and disease.**, v. 20, n. 3, p. 243–249, 2002.

CHANG, Y. Y. et al. Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway. **Biochem Soc Trans**, v. 37, n. Pt 1, p. 232–236, 2009.

CHATR-ARYAMONTRI, A. et al. The BioGRID interaction database: 2017 update. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D369–D379, 2017.

CLAUSET, A.; NEWMAN, M. E. J.; MOORE, C. Finding community structure in very large networks. p. 1–6, 2004.

CONESA, A. et al. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674–3676, 2005.

CRUZ ET AL., 2011. Efecto del Azoxystrobin Sobre *Moniliophthora roreri*, Agente Causal de la Moniliasis del Cacao (*Theobroma cacao*). **REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA**, v. 31, p. 65–69, 2013.

CSÁRDI, G.; NEPUSZ, T. The igraph software package for complex network research. **InterJournal Complex Systems**, v. 1695, p. 1–9, 2006.

CUI, T. et al. Uncovering new signaling proteins and potential drug targets through the interactome analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 118, 2009.

DA HORA JUNIOR, B. T. et al. Transcriptomics and systems biology analysis in identification of specific pathways involved in cacao resistance and susceptibility to witches' broom disease. **Molecular bioSystems**, v. 8, n. 5, p. 1507–19, abr. 2012.

DAVID, R. Cell signalling: Rho1 keeps an eye on TORC1. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 5, p. 280–281, 2012.

DE ARRUDA, M. C. C. et al. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis perniciosa* from different geographic origins and hosts. **Mycological research**, v. 107, n. Pt 1, p. 25–37, 2003.

DELGADO, J. C.; COOK, A. A. Nuclear condition of the basidia, basidiospores, and mycelium of *Marasmius pernicius*. **Canadian Journal of Botany**, v. 54, n. 1, p. 66–72, 1976.

DÍAZ-JIMÉNEZ, D. F. et al. Role of the fungal cell wall in pathogenesis and antifungal resistance. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 4, p. 275–282, 2012.

DRGONOVA, J. et al. Yeast Protein. v. 272, n. April, p. 1995–1997, 1996.

DRGONOVÁ, J. et al. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 272, n. 5259, p. 277–279, 1996.

DÜNKLER, A.; JORDE, S.; WENDLAND, J. An *Ashbya gossypii* *cts2* mutant deficient in a sporulation-specific chitinase can be complemented by *Candida albicans* CHT4. **Microbiological Research**, v. 163, n. 6, p. 701–710, 2008.

EL-AKHAL, M. R. et al. Proteomic analysis of conidia germination in *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology**, v. 195, n. 4, p. 227–246, 2013.

ENRIGHT, A. J. et al. Protein interaction maps for complete genomes based on gene fusion events. **Nature**, v. 402, n. 6757, p. 86–90, 1999.

EVANS, B. Y. H. C. Witches' broom disease of cocoa. p. 185–192, 1978.

EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicios*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, n. 3, p. 515–523, 1980.

FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database. **Nucleic acids research**, v. 36, n. Database issue, p. D281–8, jan. 2008.

FINN, R. D. et al. IPfam: A database of protein family and domain interactions found in the Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 364–373, 2014.

FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D279–D285, 2016.

FLÓREZ, A. F. et al. Protein network prediction and topological analysis in *Leishmania major* as a tool for drug target selection. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 484, 2010.

FONSECA-GARCÍA, C.; LEÓN-RAMÍREZ, C. G.; RUIZ-HERRERA, J. The regulation of different metabolic pathways through the Pal/Rim pathway in *Ustilago maydis*. **FEMS yeast research**, v. 12, n. 5, p. 547–56, ago. 2012.

FREEMAN, L. C. Centrality in Social Networks Conceptual Clarification. **Social Networks**, v. 1, n. 1968, p. 215–239, 1978.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. **Our paths might cross: The role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways** *Eukaryotic Cell*, 2009a.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Our paths might cross: The role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 11, p. 1616–1625, 2009b.

G. ALMEIDDA. Estudo da função biológica da Oxidase Alternativa (AOX) de *Moniliophthora pernicios* (fungo da vassoura de bruxa) em *Saccharomyces cerevisiae*. 2014.

GARCÍA, R. et al. A novel connection between the Cell Wall Integrity and the PKA pathways regulates cell wall stress response in yeast. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5703, 2017.

GARZÓN, J. I. et al. A computational interactome and functional annotation for the human proteome. **eLife**, v. 5, n. OCTOBER2016, p. 1–27, 2016.

GAVIN, A.-C. et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 141–147, 2002.

GESTEIRA, A. S. et al. Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora pernicios*. **Annals of botany**, v. 100, n. 1, p. 129–40, jul. 2007.

GLADFELTER, A. S. et al. Septin ring assembly involves cycles of GTP loading and hydrolysis by Cdc42p. **Journal of Cell Biology**, v. 156, n. 2, p. 315–326, 2002.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy : cellular and molecular mechanisms. **The Journal of Pathology**, v. 221, n. 1, p. 3–12, 2010.

- GOMES, D. S. et al. Mycelial development preceding basidioma formation in *Moniliophthora perniciosa* is associated to chitin, sugar and nutrient metabolism alterations involving autophagy. **Fungal Genetics and Biology**, v. 86, p. 33–46, 2016.
- GRIFFITH, G. W. et al. Witches' brooms and frosty pods: Two major pathogens of cacao. **New Zealand Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p. 423–435, 2003.
- GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis perniciosa* using a bran-vermiculite medium. v. 99, p. 227–230, 1993.
- GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis*. v. 72, n. August 1993, p. 278–289, 1994.
- GU, Z.; EILS, R.; SCHLESNER, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics**, v. 32, n. 18, p. 2847–2849, 2016.
- GUARRO, J.; PIETRO, A. DI. Rho1 has distinct functions in morphogenesis, cell wall biosynthesis and virulence of. v. 10, n. February, p. 1339–1351, 2008.
- HARRINGTON, E. D.; JENSEN, L. J.; BORK, P. Predicting biological networks from genomic data. **FEBS Letters**, v. 582, n. 8, p. 1251–1258, 2008.
- HE, F. et al. The prediction of protein-protein interaction networks in rice blast fungus. **BMC genomics**, v. 9, p. 519, 2008.
- HEDGER, J. N.; PICKERING, V.; ARAGUNDI, J. Variability of populations of the witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*). **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, n. 4, p. 533–546, 1987.
- HERMJAKOB, H. et al. IntAct: an open source molecular interaction database. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, n. Database issue, p. D452-5, 2004.
- HO, Y. et al. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 180–183, 10 jan. 2002.
- HUYNEN, M. A.; BORK, P. Measuring genome evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 11, p. 5849–5856, 1998.
- IANIRI, G.; INDRUM, AL. Essential Gene Discovery in the Basidiomycete *Cryptococcus neoformans* for Antifungal Drug Target Prioritization. **mBio**, v. 6, n. 2, p. 1–18, 2015.
- ISSERLIN, R.; EL-BADRAWI, R. A.; BADERY, G. D. The biomolecular interaction network database in PSI-MI 2.5. **Database**, v. 2011, n. May, p. 1–16, 2011.
- ITO, T. et al. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 8, p. 4569–74, 2001.
- JAFFE, A. B.; HALL, A. Rho GTPases: Biochemistry and Biology. p. 247–272, 2005.

- JEONG, H. et al. The large scale organization of metabolic networks. **Nature**, v. 407, n. 6804, p. 651–654, 2000.
- JEONG, H. et al. Lethality and centrality in protein networks. **Nature**, v. 411, n. 6833, p. 41–42, 2001.
- JONES, A. M. et al. Border Control--A Membrane-Linked Interactome of Arabidopsis. **Science**, v. 344, n. 6185, p. 711–716, 2014.
- KANEKO; ISHII, 2015. Effect of azoxystrobin on activities of antioxidant enzymes and alternative oxidase in wheat head blight pathogens... **J Gen Plant Pathol**, v. 75, n. January, p. 388–398, 2015.
- KELEKAR, A. Autophagy. v. 271, p. 259–271, 2005.
- KESHAHA PRASAD, T. S. et al. Human Protein Reference Database - 2009 update. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 767–772, 2009.
- KHURI, S.; WUCHTY, S. Essentiality and centrality in protein interaction networks revisited. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2015.
- KIM, J.-G. et al. Predicting the interactome of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* for target selection and DB service. **BMC bioinformatics**, v. 9, p. 41, 2008.
- KITAMURA, A. et al. Discovery of a Small-Molecule Inhibitor of α -1,6-Glucan Synthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 670–677, 1 fev. 2009.
- KLIONSKY, D. J. Autophagy: From phenomenology to molecular understanding in less than a decade. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 11, p. 931–937, 2007.
- KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 185–202, 2006.
- KOKKELINK, L. et al. The small GTPase BcCdc42 affects nuclear division, germination and virulence of the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 11, p. 1012–1019, 2011.
- KURTZ, M. B.; REX, J. H. Glucan synthase inhibitors as antifungal agents. **Advances in Protein Chemistry**, v. 56, p. 423–475, 2001.
- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, 2012.
- LEE, I. et al. A single gene network accurately predicts phenotypic effects of gene perturbation in *Caenorhabditis elegans*. **Nature genetics**, v. 40, n. 2, p. 181–8, 2008.
- LEVIN, D. E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. **Genetics**, v. 189, n. 4, p. 1145–1175, 2011.
- LEVINE, B. et al. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological

functions of autophagy. **Developmental cell**, v. 6, n. 4, p. 463–77, 2004.

LICATA, L. et al. MINT, the molecular interaction database: 2012 Update. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. 857–861, 2012.

LIN, M. et al. The Predicted Arabidopsis Interactome Resource and Network Topology-Based Systems Biology Analyses. **The Plant Cell**, v. 23, n. 3, p. 911–922, 2011.

LIU, J.; BALASUBRAMANIAN, M. K. 1,3-beta-Glucan synthase: a useful target for antifungal drugs. **Current drug targets. Infectious disorders**, v. 1, n. 2, p. 159–69, 2001.

LIU, S. et al. A computational interactome for prioritizing genes associated with complex agronomic traits in rice (*Oryza sativa*). **The Plant Journal**, v. 90, n. 1, p. 177–188, abr. 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

LOCKSHON, D. et al. Rho Signaling Participates in Membrane Fluidity Homeostasis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–10, 2012.

LOEWITH, R. et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. **Molecular Cell**, v. 10, n. 3, p. 457–468, 2002.

LOEWITH, R.; HALL, M. N. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. **Genetics**, v. 189, n. 4, p. 1177–1201, 2011.

MADDEN, K.; SNYDER, M. Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. p. 687–744, 1998.

MAERE, S.; HEYMANS, K.; KUIPER, M. BiNGO: A Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3448–3449, 2005.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D222–D226, 2015.

MARCOTTE, E. M. et al. Detecting Protein Function and Protein-Protein Interactions from Genome Sequences. **Science (New York, N.Y.)**, v. 285, n. 5428, p. 751–753, 2014.

MARELLI, J. et al. Infection Biology of *Moniliophthora perniciosa* on *Theobroma cacao* and Alternate Solanaceous Hosts. p. 149–160, 2009.

MARES, J. H. et al. Protein profile and protein interaction network of *Moniliophthora perniciosa* basidiospores. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 120, 2016a.

MARES, J. H. et al. Protein profile and protein interaction network of *Moniliophthora perniciosa* basidiospores. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 120, 2016b.

MARES, J. H. et al. Proteomic analysis during of spore germination of *Moniliophthora*

perniciosa, the causal agent of witches' broom disease in cacao. p. 1–10, 2017.

MATTHEWS, L. R. et al. Identification of Potential Interaction Networks Using Sequence-Based Searches for Conserved Protein-Protein Interactions or ' ' Interologs ' ' Identification of Potential Interaction Networks Using Sequence-Based Searches for Conserved Protein-Protein Inte. **Genome Research**, p. 2120–2126, 2001.

MCCANN, M. P.; SNETSELAAR, K. M. A genome-based analysis of amino acid metabolism in the biotrophic plant pathogen *Ustilago maydis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. SUPPL. 1, p. 77–87, 2008.

MEINHARDT, L. W. et al. In Vitro Production of Biotrophic-Like Cultures of *Crinipellis perniciosa*, the Causal Agent of Witches' Broom Disease of *Theobroma cacao*. v. 52, p. 191–196, 2006.

MEINHARDT, L. W. et al. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: What's new from this old foe? **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 5, p. 577–588, 2008.

MELO, S. C. et al. Altered phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae* by heterologous expression of basidiomycete *moniliophthora perniciosa* SOD2 gene. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 12324–12344, 2015.

MONDEGO ET AL., 2008. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. **BMC Genomics**, v. 25, p. 1–25, 2008.

MORENO-HAGELSIEB, G.; LATIMER, K. Choosing BLAST options for better detection of orthologs as reciprocal best hits. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 24, n. 3, p. 319–24, 1 fev. 2008.

NAIR, U. et al. SNARE proteins are required for macroautophagy. **Cell**, v. 146, n. 2, p. 290–302, 2011.

NEIMAN, A. M. Ascospore Formation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Ascospore Formation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 69, n. 4, p. 565–584, 2005.

NEWMAN, M. E. J. Fast algorithm for detecting community structure in networks. n. 2, p. 1–5, 2003.

NOIR, S. et al. A proteomic analysis of powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) conidiospores. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 2, p. 223–236, 2009.

NONAKA, H. et al. A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO journal**, v. 14, n. 23, p. 5931–5938, 1995.

OGATA, H. et al. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 1, p. 29–34, 1999.

OH, Y. T. et al. Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, n. 3, p. 246–253, 2010.

OLIVEIRA; LUZ, 2005. **Identificação e Manejo das Principais Doenças do Cacaueiro no Brasil**. [s.l: s.n.].

ONISHI, J. et al. Discovery of novel antifungal (1,3)-beta-D-glucan synthase inhibitors. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 368–377, 2000.

OZAKI, K. et al. Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO journal**, v. 15, n. 9, p. 2196–207, 1996.

P. ERDÖS, A. R. The Evolution of Random Graphs. **Transactions of the American Mathematical Society**, v. 286, n. 1, p. 257, 1984.

PARK, D. et al. Comparative interactomics analysis of protein family interaction networks using PSIMAP (protein structural interactome map). **Bioinformatics**, v. 21, n. 15, p. 3234–3240, 2005.

PEARSON, W. R. An introduction to sequence similarity (“homology”) searching. **Current Protocols in Bioinformatics**, n. SUPPL.42, p. 1–8, 2013.

PEREZ, P.; RINCÓN, S. A. Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. **Biochemical Journal**, v. 426, n. 3, p. 243–253, 2010.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e–45, 2001.

PHIZICKY, E. M.; FIELDS, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 94–123, 1995.

PICKERI; HEDGER, 1987. PRODUCTION OF BASIDIOCARPS OF THE COCOA PATHOGEN *CRINIPPELLIS PERNICIOSA* IN IN VITRO CULTURE. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 25, p. 2–4, 1987.

PINTO, L. R. M.; PIRES, J. L. Seleção de plantas de cacau resistentes à vassoura-de-bruxa. p. 35 p (Boletim Técnico No 181), 1998.

PIRES, A. B. L. et al. Early development of *Moniliophthora perniciosa* basidiomata and developmentally regulated genes. **BMC microbiology**, v. 9, p. 158, 2009.

PLOETZ, R. C. Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1634–1639, 2007.

PLOTNIKOV, A. et al. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 9, p. 1619–1633, 2011.

POLLACK, J. K.; HARRIS, S. D.; MARTEN, M. R. Autophagy in filamentous fungi. **Fungal**

Genetics and Biology, v. 46, n. 1, p. 1–8, 2009.

POLONI, J. DE F. et al. *Biologia de Sistemas*. p. 116–146, 2014.

POWELL, J. F.; STRANGE, R. E. Biochemical changes occurring during the germination of bacterial spores. **The Biochemical journal**, v. 54, n. 2, p. 205–9, 1953.

PUNGARTNIK, C. et al. Reactive oxygen species and autophagy play a role in survival and differentiation of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 6–7, p. 461–472, 2009a.

PUNGARTNIK, C. et al. High-Affinity Copper Transport and Snq2 Export Permease of *Saccharomyces cerevisiae* Modulate Cytotoxicity of PR-10 from *Theobroma cacao*. **Society**, v. 22, n. 1, p. 39–51, 2009b.

PURDY; DICKSTEIN, 1990. **Basidiocarp development on mycelial mats of *Crinipellis perniciosa***, 1990.

PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. STATUS OF CACAO WITCHES' BROOM: biology, epidemiology, and management. **Annual review of phytopathology**, v. 34, p. 573–594, 1996.

QADOTA. identification of Yeast Rho1 p GTPase as a Regulatory Subunit of 1,3-P-Glucan Synthase. **Science**, v. 272, n. April, p. 279–281, 1996.

QI, Y.; NOBLE, W. S. Protein interaction networks: Protein domain interaction and protein function prediction. **Handbook of Statistical Bioinformatics**, p. 427–459, 2011.

REZENDE, A. M. et al. Computational Prediction of Protein-Protein Interactions in *Leishmania* Predicted Proteomes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

REZENDE, A. M. Predição Computacional de Interações de Proteína- Proteína em Proteomas Preditos de. 2012.

RIVALS, I. et al. Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: Which test? **Bioinformatics**, v. 23, n. 4, p. 401–407, 2007.

ROLLIN-PINHEIRO, R. et al. Sphingolipids as targets for treatment of fungal infections. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1469–1484, 2016.

SAADATPOUR, A.; ALBERT, R. Boolean modeling of biological regulatory networks: A methodology tutorial. **Methods**, v. 62, n. 1, p. 3–12, 2013.

SANTOS, R. X.; BRENDDEL, M.; PUNGARTNIK, C. Carbon source-dependent variation of acquired mutagen resistance of *Moniliophthora perniciosa* : Similarities in natural and artificial systems. v. 45, p. 851–860, 2008.

SATO, T. et al. The inference of protein-protein interactions by co-evolutionary analysis is improved by excluding the information about the phylogenetic relationships. **Bioinformatics**, v. 21, n. 17, p. 3482–3489, 2005.

SAUER U., H. M.; ZAMBONI, N. Getting Closer to the Whole Picture. **Science**, v. 316, n. 5824, p. 550–551, 2007.

SCARPARI, L. M. et al. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicios*a. v. 56, n. 413, p. 865–877, 2005.

SCHMELZLE, T.; HALL, M. N. TOR, a central controller of cell growth. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 253–262, 2000.

SCHMIDT, A.; SCHMELZLE, T.; HALL, M. N. The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1433–1441, 2002.

SCHWEIZER, M. et al. The pentafunctional FAS1 gene of yeast: its nucleotide sequence and order of the catalytic domains. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 203, n. 3, p. 479–486, 1986.

SCOTT, J. **Social network analysis: A handbook** SAGE Publications, 2000. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Social+Network+Analysis+A+Handbook#6>>

SENA, K.; ALEMANNO, L.; GRAMACHO, K. P. The infection process of *Moniliophthora pernicios*a in cacao. **Plant Pathology**, v. 63, n. 6, p. 1272–1281, 2014a.

SENA, K.; ALEMANNO, L.; GRAMACHO, K. P. The infection process of *Moniliophthora pernicios*a in cacao. **Plant Pathology**, 2014b.

SHENG ZHAO; FERNALD, R. D. Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. v. 12, n. 8, p. 1047–1064, 2009.

SHERTZ, C. A et al. Conservation, duplication, and loss of the Tor signaling pathway in the fungal kingdom. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 510, 2010.

SHIN, K. S. et al. Differential roles of the chitinase in autolysis and cell death of *Aspergillus nidulans*. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 5, p. 738–746, 2009.

SHOJI, J. YA; KIKUMA, T.; KITAMOTO, K. Vesicle trafficking, organelle functions, and unconventional secretion in fungal physiology and pathogenicity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 20, p. 1–9, 2014.

SILVA, F. A. C. et al. Proteomic response of *Moniliophthora pernicios*a exposed to pathogenesis-related protein-10 from *Theobroma cacao*. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4855–4868, 2013.

SKRABANEK, L. et al. Computational prediction of protein-protein interactions. **Molecular Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 1–17, 2008.

SREENIVASAN, T. N.; DABYDEEN, S. **Modes of Penetration of Young Cocoa Leaves by *Crinipellis pernicios*a.**, 1978.

STEINBERG, G.; PEREZ-MARTIN, J. *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. **Trends in Cell Biology**, v. 18, n. 2, p. 61–67, 2008.

SUDBERY. Regulation of polarised growth in fungi. **fungal biology reviews**, v. 22, p. 44–55, 2008.

SZKLARCZYK, D. et al. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D447–D452, 2015.

TAPON, N.; HALL, A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 1, p. 86–92, 1997.

TEIXEIRA, P. J. P. L. et al. High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Cell**, v. 26, n. 11, p. 4245–4269, 2014.

THOMAZELLA. The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. p. 1025–1034, 2012.

VALDIVIESO, M. H. et al. Chitin synthesis in a *gas1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 17, p. 4752–4757, 2000.

VILLELA-DIAS, C. et al. Nep1-like protein from *Moniliophthora perniciosa* induces a rapid proteome and metabolome reprogramming in cells of *Nicotiana benthamiana*. **Physiologia Plantarum**, v. 150, n. 1, p. 1–17, 2014.

VON MERING, C. et al. STRING: Known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. DATABASE ISS., p. 433–437, 2005.

WANG, Y. et al. AIM: A comprehensive Arabidopsis interactome module database and related interologs in plants. **Database**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

WEBER, M. et al. Ectopic expression of a constitutively active Cdc42 small GTPase alters the morphology of haploid and dikaryotic hyphae in the filamentous homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 7, p. 624–637, 2005.

WILSON, R. A. et al. Towards Defining Nutrient Conditions Encountered by the Rice Blast Fungus during Host Infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–9, 2012.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real Time for mRNA quantitation. v. 39, n. 1, p. 1–11, 2005.

WULLSCHLEGER, S. et al. Molecular organization of target of rapamycin complex 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 35, p. 30697–30704, 2005.

XENARIOS, I. DIP, the Database of Interacting Proteins: a research tool for studying cellular networks of protein interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 303–305, 2002.

XIWEI ZHENG, CONG BI, MARISSA BROOKS, AND D. S. H. Sphingolipid Signaling in Fungal Pathogens. **Anal Chem.**, v. 25, n. 4, p. 368–379, 2015.

XU, K. et al. Path lengths in protein-protein interaction networks and biological complexity. **Proteomics**, v. 11, n. 10, p. 1857–1867, 2011.

YAMAUCHI, N. et al. Chlorophyll degradation in Wase satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit with on-tree maturation and ethylene treatment. **Scientia Horticulturae**, v. 71, n. 1–2, p. 35–42, nov. 1997.

YAN, G.; LAI, Y.; JIANG, Y. The TOR Complex 1 Is a Direct Target of Rho1 GTPase. **Molecular Cell**, v. 45, n. 6, p. 743–753, 2012.

YU, H. et al. Annotation Transfer Between Genomes : Protein – Protein Interologs and Protein – DNA Regulogs. **Genome Research**, p. 1107–1118, 2004.

YU, H. et al. The importance of bottlenecks in protein networks: Correlation with gene essentiality and expression dynamics. **PLoS Computational Biology**, v. 3, n. 4, p. 713–720, 2007.

ZHANG, F. et al. Genome-wide inference of protein interaction network and its application to the study of crosstalk in Arabidopsis abscisic acid signaling. **Plant Physiology**, v. 171, n. June, p. pp.00057.2016, 2016.

LISTA DE LEGENDAS

FIG. 1. Fluxograma desse trabalho. i. Busca de homólogos por Blasp (PEIMAP e STRING), de domínios por *Hidden Markov Model*-HMM (PFAM), de domínios baseado em *Structural Classification of Proteins* (SCOP) usando PSIBLAST. ii. Obtendo de arquivo de interação (*Network*) comparando o resultado de i, com o arquivo de interação de cada banco; iii. calcul da confiança para cada par de interação e normalização entre 0-1. iv. combinação do score de todos os métodos e obtenção do arquivo de interação com o score combinado. v. seleção do interatoma com alta confiança (score ≥ 700) e seleção de proteínas relacionadas com a fase biotrófica; vi. análises de rede. (*) ponto de corte para identidade no BlastP; (**) ponto de corte para *E-value* dentro do respectivo método (HMM, Blast, ou PSIBLAST)

FIG. 2. Número de interações preditas por cada método (PEIMAP, PFAM, PSIMAP e STRING).

FIG. 3. MpNet. As diferentes cores da rede representam os diferentes módulos identificados, com os respectivos processos biológicos que mais se destacaram em relação ao *p-value* corrigido ou ao processo. O gráfico no canto superior direito mostra o ajuste da rede de *M. pernicioso* à lei de potência (*Power law*). A probabilidade que um nó possua muitas conexões é muito baixa e de muitos nós terem poucas conexões é muito alta. O coeficiente de determinação (R^2) indica o quanto os dados podem ser explicados pelo modelo proposto. Variando entre 0-1, quanto mais próximo de 1, mais confiável é o modelo. Os nós grandes de formato circular são proteínas encontradas como *best hit* quando realizamos o Blastx dos transcritos diferencialmente expressos relacionados com a formação do basidiocarpo em *M. pernicioso*. Os nós grandes de formato quadrangular, são proteínas associadas a germinação de esporos de *M. pernicioso*. Os nós de tamanho ainda maior, em formato retangular que são proteínas encontradas tanto em trabalhos relacionados com formação do basidiocarpo e como na germinação de esporos.

FIG. 4. Gráfico das centralidades *betweenness* (y)~*Degree* (x). Os eixos tracejados na horizontal e vertical indicam o ponto de corte a média dos valores de *Betweenness* e *Degree*. Nesse gráfico, destacamos quatro quadrantes: i. C, são proteínas com centralidade abaixo da média para *Degree* e *Betweenness* e são considerados comuns (C); ii. proteínas com centralidade acima da média para *Degree* são consideradas *Hub* (H); iii. proteínas com centralidade acima da média para *Betweenness*, são consideradas *Bottleneck* (B); iv, proteínas que possuem média para *Degree* e *Betweenness* acima da média são consideradas *Hub-Bottleneck* (HB). As cores do gráfico, destacam as respectivas funções biológicas de cada proteína, que são respectivas a aquelas cores destacadas na rede (FIG. 3). Os “*” destacam as proteínas encontradas em trabalhos relacionados com desenvolvimento do basidiocarpo (*) e desenvolvimento dos esporos (**) em *M. pernicioso*.

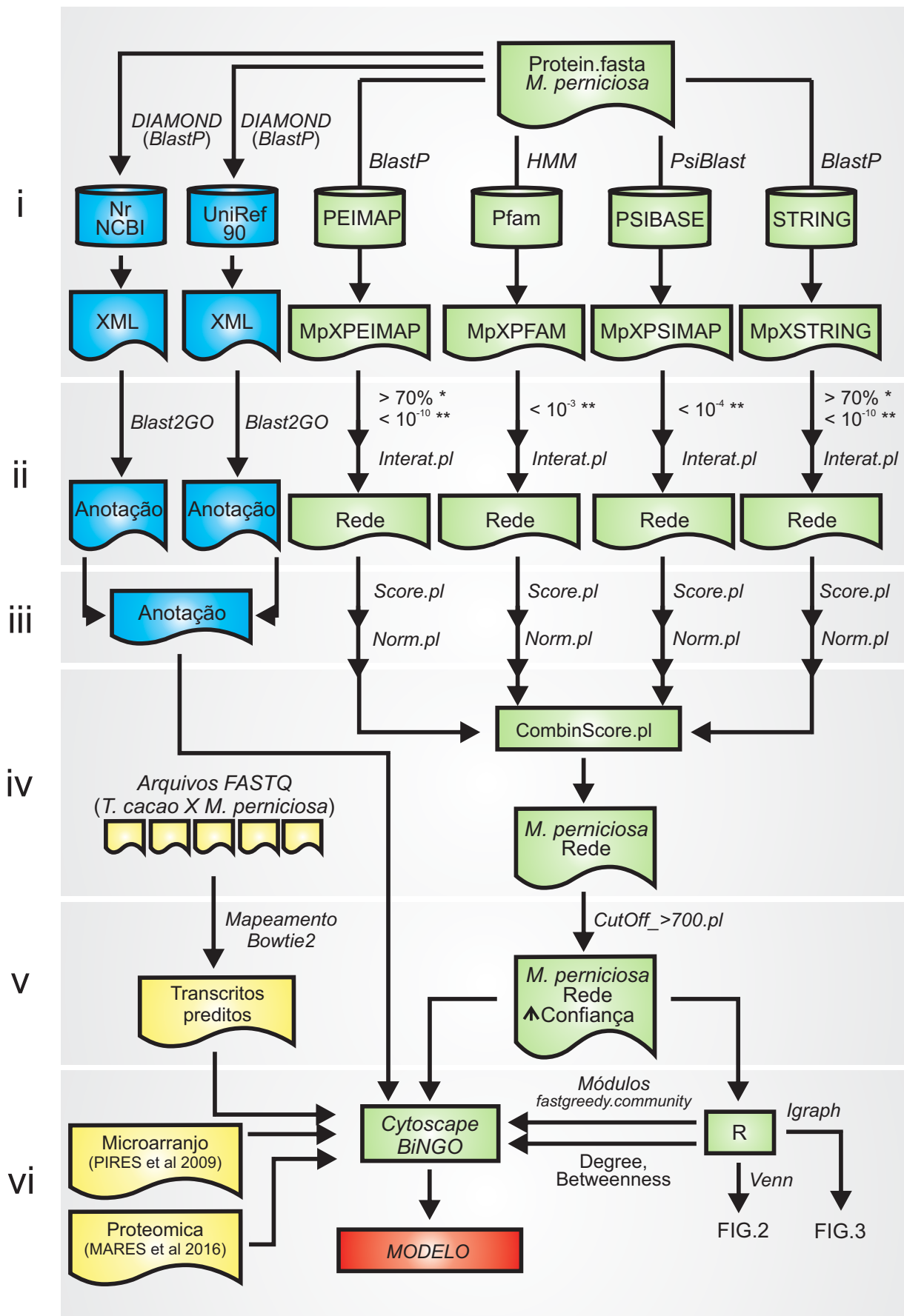


FIG. 1. Silva et al

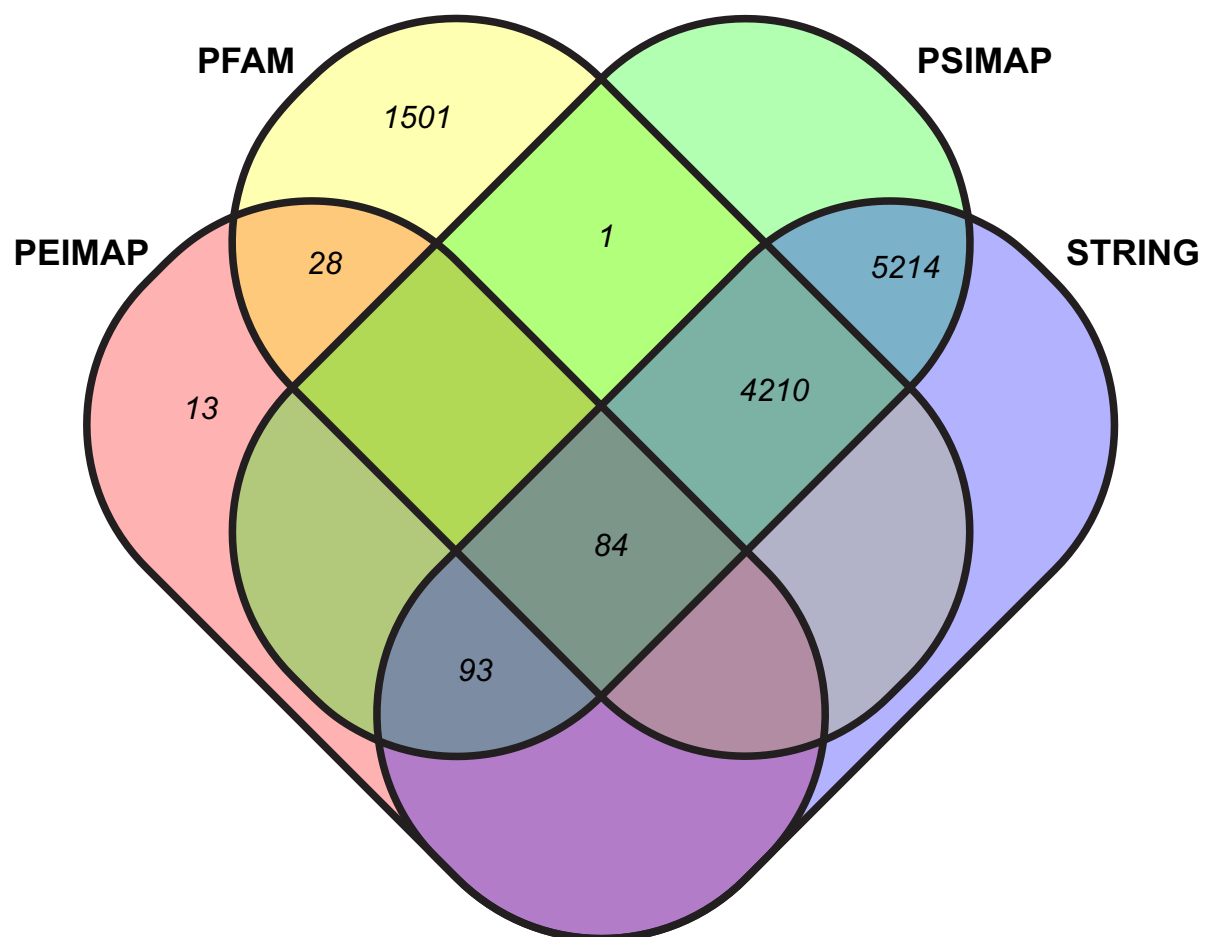


FIG. 2. Silva et al

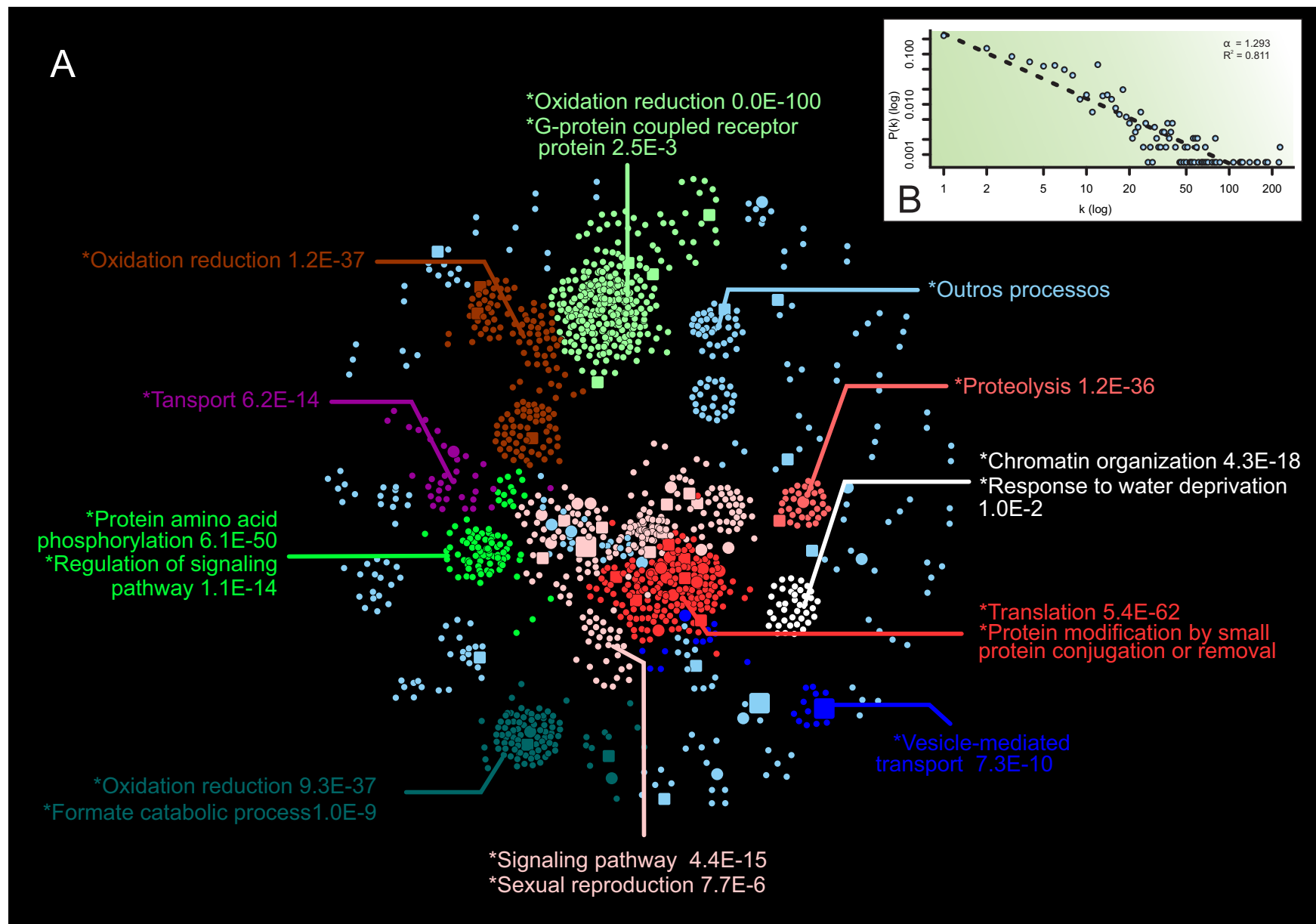


FIG. 3. Silva et al

Tabela 1. Análise de enriquecimento dos principais módulos (Clusters) identificados na rede de M. pernicioso

Cluster	GO-ID	corr p-value	Description	Genes in test set
Cluster A	23033	4,46E-11	signaling pathway	SCA31.22.1 SCA26.26.1 SCA93.24.1 SCA246.7.1 SCA164.23.1 SCA12.51.1 SCA6.73.1 SCA229.4.1 SCA349.3.1 SCA102.31.1 SCA366.4.1 SCA145.6.1 SCA190.13.1 SCA19.46.1 SCA176.15.1 SCA155.0.1 SCA194.20.1 SCA55.28.1 SCA499.4.1 SCA847.1.1 SCA205.0.1 SCA146.7.1 SCA648.1.1 SCA600.2.1 SCA28.77.1 SCA164.10.1 SCA254.2.1 SCA29.22.1 SCA50.28.1 SCA236.3.1 SCA31.9.1
	19953	7,77E-02	sexual reproduction	SCA19.46.1 SCA26.26.1 SCA28.64.1 SCA93.24.1 SCA349.3.1 SCA246.7.1 SCA393.6.1
Cluster B	6412	5,41E-58	translation	SCA48.44.1 SCA102.15.1 SCA47.18.1 SCA6.30.1 SCA239.11.1 SCA259.7.1 SCA290.6.1 SCA500.1.1 SCA84.36.1 SCA18.59.1 SCA18.95.1 SCA31.31.1 SCA97.23.1 SCA209.14.1 SCA1.77.1 SCA163.0.1 SCA137.10.1 SCA1384.0.1 SCA282.7.1 SCA287.8.1 SCA12.12.1 SCA67.8.1 SCA553.1.1 SCA46.38.1 SCA88.21.1 SCA70.17.1 SCA56.27.1 SCA46.22.1 SCA104.10.1 SCA40.8.1 SCA2.69.1 SCA31.7.1 SCA105.25.1 SCA422.2.1 SCA4.73.1 SCA14.3.1 SCA483.0.1 SCA363.10.1 SCA280.5.1 SCA52.14.1 SCA28.18.1 SCA67.16.1 SCA190.3.1 SCA30.54.1 SCA6.2.1 SCA104.23.1 SCA28.7.1 SCA49.10.1 SCA3.95.1 SCA12.33.1 SCA48.15.1 SCA3.30.1 SCA379.5.1 SCA13.82.1 SCA149.7.1 SCA18.37.1 SCA10.60.1 SCA169.14.1 SCA500.6.1 SCA106.5.1 SCA59.8.1 SCA104.7.1 SCA47.27.1 SCA54.18.1 SCA3.100.1 SCA26.38.1 SCA3.140.1 SCA48.14.1 SCA282.8.1 SCA501.1.1 SCA254.13.1 SCA2.2.1 SCA2.136.1 SCA88.20.1 SCA222.13.1 SCA104.13.1 SCA3.88.1 SCA491.2.1 SCA18.7.1 SCA14.2.1 SCA18.81.1 SCA18.47.1 SCA1.131.1 SCA4.78.1
Cluster C	70647	1,89E-04	protein modification by small protein conjugation or removal	SCA13.77.1 SCA14.81.1 SCA7.68.1 SCA209.16.1 SCA325.7.1 SCA97.14.1 SCA3.36.1 SCA11.87.1 SCA117.15.1 SCA449.6.1 SCA118.5.1 SCA6.99.1 SCA40.8.1 SCA118.14.1 SCA10.60.1 SCA21.27.1
	55114	1,29E-33	oxidation reduction	SCA395.0.1 SCA581.0.1 SCA128.9.1 SCA3.115.1 SCA14.66.1 SCA512.0.1 SCA135.18.1 SCA883.0.1 SCA336.10.1 SCA158.0.1 SCA362.0.1 SCA9.12.1 SCA29.4.1 SCA6.70.1 SCA7.28.1 SCA112.3.1 SCA782.0.1 SCA75.29.1 SCA16.66.1 SCA16.62.1 SCA181.6.1 SCA120.6.1 SCA35.22.1 SCA91.25.1 SCA10.8.1 SCA266.9.1 SCA3.118.1 SCA454.0.1 SCA88.10.1 SCA42.17.1 SCA273.7.1 SCA21.8.1 SCA196.11.1 SCA53.33.1 SCA692.2.1 SCA185.10.1 SCA82.41.1 SCA29.7.1 SCA7.88.1 SCA6.71.1 SCA273.3.1 SCA185.4.1 SCA291.9.1 SCA75.22.1 SCA53.26.1 SCA25.53.1 SCA496.5.1 SCA75.4.1 SCA218.6.1 SCA129.15.1 SCA288.3.1 SCA3.113.1 SCA69.35.1 SCA19.59.1 SCA78.14.1 SCA484.2.1 SCA238.11.1 SCA88.23.1 SCA7.87.1 SCA141.2.1 SCA50.14.1 SCA273.2.1 SCA960.2.1 SCA69.23.1 SCA181.8.1 SCA7.111.1 SCA278.7.1 SCA181.4.1 SCA185.7.1 SCA384.8.1 SCA49.24.1 SCA36.35.1 SCA129.10.1 SCA128.8.1 SCA191.3.1 SCA454.2.1 SCA51.22.1 SCA133.14.1 SCA99.2.1 SCA415.3.1 SCA336.7.1 SCA289.7.1 SCA75.31.1 SCA828.0.1 SCA484.1.1 SCA124.3.1 SCA428.6.1 SCA57.33.1 SCA69.25.1 SCA29.5.1 SCA53.39.1 SCA69.24.1 SCA265.4.1 SCA181.5.1 SCA91.24.1 SCA6.84.1 SCA50.20.1 SCA113.8.1 SCA75.2.1 SCA53.28.1

Cluster D	55114	0.0000E-100	oxidation reduction	SCA147.19.1 SCA526.3.1 SCA220.4.1 SCA615.3.1 SCA241.1.1 SCA1.154.1 SCA717.0.1 SCA16.73.1 SCA246.6.1 SCA137.7.1 SCA412.7.1 SCA631.3.1 SCA7.105.1 SCA627.2.1 SCA379.4.1 SCA137.21.1 SCA282.10.1 SCA814.0.1 SCA120.14.1 SCA198.3.1 SCA168.17.1 SCA249.7.1 SCA413.5.1 SCA45_1_159984.25.1 SCA113.9.1 SCA114.11.1 SCA261.0.1 SCA133.22.1 SCA27.20.1 SCA9.20.1 SCA69.7.1 SCA135.4.1 SCA435.0.1 SCA10.15.1 SCA279.10.1 SCA829.0.1 SCA110.8.1 SCA1229.0.1 SCA458.1.1 SCA246.5.1 SCA107.5.1 SCA196.0.1 SCA9.55.1 SCA9.5.1 SCA43.49.1 SCA309.3.1 SCA23.55.1 SCA188.6.1 SCA26.12.1 SCA167.1.1 SCA120.15.1 SCA24.63.1 SCA37.33.1 SCA331.11.1 SCA284.11.1 SCA45_1_159984.26.1 SCA337.3.1 SCA540.6.1 SCA85.11.1 SCA58.4.1 SCA69.8.1 SCA66.5.1 SCA202.7.1 SCA150.17.1 SCA292.13.1 SCA351.0.1 SCA829.1.1 SCA381.0.1 SCA266.4.1 SCA325.1.1 SCA110.11.1 SCA691.3.1 SCA1293.0.1 SCA133.17.1 SCA763.1.1 SCA99.7.1 SCA319.8.1 SCA263.6.1 SCA137.5.1 SCA319.0.1 SCA716.0.1 SCA649.3.1 SCA10.80.1 SCA132.4.1 SCA615.1.1 SCA213.10.1 SCA113.10.1 SCA606.3.1 SCA168.19.1 SCA808.1.1 SCA59.1.1 SCA757.1.1 SCA265.5.1 SCA337.4.1 SCA523.3.1 SCA592.0.1 SCA603.1.1 SCA133.20.1 SCA66.6.1 SCA129.8.1 SCA83.0.1 SCA100.13.1 SCA223.3.1 SCA47.56.1 SCA435.2.1 SCA409.5.1 SCA457.1.1 SCA249.1.1 SCA9.41.1 SCA134.8.1 SCA351.1.1 SCA325.0.1 SCA62.23.1 SCA23.23.1 SCA133.18.1 SCA691.2.1 SCA22.0.1 SCA241.8.1 SCA441.1.1 SCA657.2.1 SCA246.10.1 SCA29.72.1 SCA203.7.1 SCA429.0.1 SCA168.18.1 SCA70.33.1 SCA435.9.1 SCA70.10.1 SCA664.0.1 SCA3.104.1 SCA71.1.1 SCA59.0.1 SCA302.2.1 SCA262.13.1 SCA88.13.1 SCA292.5.1 SCA12.20.1 SCA199.0.1 SCA474.8.1 SCA165.3.1 SCA113.12.1 SCA1.87.1 SCA301.8.1 SCA41.56.1 SCA16.77.1 SCA208.7.1 SCA283.10.1 SCA35.30.1 SCA255.0.1 SCA133.15.1 SCA120.22.1 SCA196.3.1 SCA298.0.1 SCA107.8.1 SCA425.8.1 SCA388.6.1 SCA29.73.1 SCA107.0.1 SCA162.9.1 SCA68.4.1 SCA517.1.1 SCA247.0.1 SCA459.2.1 SCA245.11.1 SCA168.13.1 SCA23.37.1 SCA50.3.1 SCA70.19.1 SCA347.1.1 SCA18.88.1 SCA245.4.1 SCA100.7.1 SCA435.4.1 SCA19.58.1 SCA581.1.1 SCA70.23.1 SCA298.1.1 SCA237.3.1 SCA75.14.1 SCA138.10.1 SCA301.10.1 SCA323.4.1 SCA118.25.1 SCA188.2.1 SCA517.2.1 SCA266.17.1 SCA68.5.1 SCA649.2.1 SCA37.37.1 SCA592.1.1 SCA70.35.1 SCA245.3.1 SCA129.9.1 SCA413.8.1 SCA15.22.1 SCA219.0.1 SCA435.3.1 SCA169.2.1 SCA131.21.1 SCA255.11.1 SCA599.0.1 SCA87.4.1 SCA52.0.1 SCA196.1.1 SCA246.4.1 SCA213.4.1 SCA273.6.1 SCA243.10.1 SCA88.27.1 SCA323.5.1 SCA118.24.1 SCA107.2.1 SCA188.14.1 SCA266.16.1 SCA632.3.1 SCA9.10.1 SCA165.17.1 SCA23.39.1 SCA893.2.1 SCA464.2.1 SCA332.3.1 SCA173.15.1 SCA120.16.1 SCA292.8.1 SCA248.7.1 SCA453.2.1 SCA168.9.1 SCA4.111.1 SCA321.1.1 SCA325.4.1 SCA496.2.1 SCA7.79.1 SCA131.22.1 SCA717.1.1 SCA20
	7186	2,5E-03	G-protein coupled receptor protein signaling pathway	SCA292.5.1 SCA107.2.1 SCA691.2.1 SCA292.13.1 SCA691.3.1 SCA107.0.1 SCA413.8.1 SCA435.0.1 SCA107.5.1 SCA631.3.1 SCA107.8.1

Cluster E	6468	6,18E-46	protein amino acid phosphorylation	SCA322.3.1 SCA23.47.1 SCA1.231.1 SCA238.13.1 SCA1313.0.1 SCA157.2.1 SCA472.7.1 SCA141.6.1 SCA181.0.1 SCA175.2.1 SCA340.11.1 SCA574.4.1 SCA32.45.1 SCA565.4.1 SCA59.7.1 SCA23.73.1 SCA316.1.1 SCA308.4.1 SCA307.0.1 SCA274.2.1 SCA167.10.1 SCA529.4.1 SCA59.11.1 SCA568.3.1 SCA270.3.1 SCA270.7.1 SCA129.12.1 SCA48.8.1 SCA23.42.1 SCA108.3.1 SCA288.2.1 SCA615.2.1 SCA518.4.1 SCA131.3.1 SCA467.3.1 SCA512.1.1 SCA189.13.1 SCA408.7.1 SCA246.12.1 SCA388.7.1 SCA203.9.1 SCA137.20.1 SCA615.0.1 SCA129.17.1 SCA112.19.1 SCA120.11.1 SCA114.10.1 SCA11.95.1 SCA296.2.1 SCA328.12.1 SCA449.7.1 SCA3.29.1 SCA112.17.1 SCA59.12.1 SCA212.10.1 SCA270.6.1 SCA187.16.1 SCA23.43.1 SCA156.4.1 SCA129.13.1
Cluster F	35466	1,17E-10	regulation of signaling pathway	SCA316.1.1 SCA615.2.1 SCA5.2.1 SCA512.1.1 SCA1313.0.1 SCA246.12.1 SCA112.17.1 SCA59.11.1 SCA59.12.1 SCA141.6.1 SCA181.0.1 SCA129.12.1 SCA187.16.1 SCA23.42.1 SCA108.3.1 SCA59.7.1 SCA129.13.1
	6886	6,28E-10	intracellular protein transport	SCA749.0.1 SCA21.81.1 SCA19.63.1 SCA306.3.1 SCA2.41.1 SCA11.93.1 SCA30.25.1 SCA501.5.1 SCA533.2.1 SCA5.144.1 SCA10.18.1 SCA25.40.1 SCA39.47.1 SCA119.18.1 SCA31.11.1
Cluster F	16192	7,33E-06	vesicle-mediated transport	SCA89.16.1 SCA360.2.1 SCA49.31.1 SCA192.8.1 SCA3.62.1 SCA62.6.1 SCA488.2.1 SCA288.10.1 SCA30.63.1 SCA131.8.1 SCA120.9.1
Cluster G	55114	9,31E-33	oxidation reduction	SCA227.14.1 SCA113.18.1 SCA16.33.1 SCA13.5.1 SCA343.4.1 SCA343.2.1 SCA22.62.1 SCA386.8.1 SCA343.8.1 SCA133.11.1 SCA343.6.1 SCA7.107.1 SCA525.5.1 SCA277.9.1 SCA15.33.1 SCA113.23.1 SCA176.11.1 SCA16.3.1 SCA76.9.1 SCA1532.0.1 SCA639.2.1 SCA404.0.1 SCA159.10.1 SCA281.0.1 SCA698.0.1 SCA157.13.1 SCA14.35.1 SCA75.23.1 SCA113.1.1 SCA404.4.1 SCA4.153.1 SCA23.8.1 SCA3.22.1 SCA113.7.1 SCA3.41.1 SCA15.46.1 SCA75.1.1 SCA398.8.1 SCA444.3.1 SCA398.6.1 SCA16.11.1 SCA556.5.1 SCA10.57.1 SCA113.17.1 SCA517.0.1 SCA175.15.1 SCA343.3.1 SCA343.9.1 SCA512.5.1 SCA343.7.1 SCA564.1.1 SCA43.43.1 SCA181.1.1 SCA176.9.1 SCA294.6.1 SCA176.7.1 SCA1262.0.1 SCA316.12.1 SCA55.2.1 SCA95.13.1 SCA286.0.1 SCA129.24.1 SCA4.57.1 SCA405.7.1 SCA177.5.1 SCA2.87.1 SCA28.29.1 SCA14.11.1 SCA14.34.1 SCA92.25.1 SCA6.42.1 SCA113.2.1 SCA78.10.1 SCA75.6.1 SCA113.6.1 SCA4.150.1 SCA74.6.1 SCA338.1.1 SCA182.7.1 SCA444.4.1 SCA130.8.1 SCA398.7.1
	15942	1,09E-05	formate metabolic process	SCA4.57.1 SCA1532.0.1 SCA175.15.1 SCA1262.0.1 SCA338.1.1 SCA316.12.1 SCA564.1.1
Cluster H	6325	4,35E-14	chromatin organization	SCA193.0.1 SCA78.4.1 SCA247.14.1 SCA1886.0.1 SCA399.2.1 SCA49.7.1 SCA43.14.1 SCA99.23.1 SCA82.32.1 SCA195.8.1 SCA6.122.1 SCA716.1.1 SCA245.7.1 SCA153.23.1 SCA163.20.1 SCA61.29.1
	9414	1,05E+02	response to water deprivation	SCA1886.0.1

5 CONCLUSÃO

Assim, conseguimos entender que a síntese e degradação de quitina é coordenada por uma série de processos de sinalização e talvez a síntese de glucano seja um processo mais relevante para *M. pernicioso*, quando consideramos a centralidade das proteínas envolvidas na produção de glucano (FKS1) e no controle desse processo (RHO1 e ROM2). Por outro lado o equilíbrio entre a síntese e reciclagem de nutrientes na célula, demonstra um fenômeno marcante para o sucesso de *M. pernicioso*, durante seu desenvolvimento. Nossos estudos relacionados com análises de redes foram a chave para entender melhor o desenvolvimento e selecionar genes centrais para o sistema de *M. pernicioso* em diversos estágios, desde os processos germinativos do esporo, até a produção de estruturas reprodutoras.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, A.; HOSSAIN, L.; LEYDESDORFF, L. Betweenness centrality as a driver of preferential attachment in the evolution of research collaboration networks. **Journal of Informetrics**, v. 6, n. 3, p. 403–412, 2012a.
- ABBASI, A.; HOSSAIN, L.; LEYDESDORFF, L. Betweenness centrality as a driver of preferential attachment in the evolution of research collaboration networks. **Journal of Informetrics**, v. 6, n. 3, p. 403–412, 2012b.
- ADAMI, A. et al. Structure of TOR and Its Complex with KOG1. **Molecular Cell**, v. 27, n. 3, p. 509–516, 2007.
- AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v. 97, n. 5, p. 1012–1022, 1 set. 2005.
- ALBERT, R.; JEONG, H.; BARABÁSI, A.-L. Error and attack tolerance of complex networks. **Nature**, v. 406, n. 6794, p. 378–382, 27 jul. 2000.
- ARGÔLO SANTOS CARVALHO, H. et al. Polygalacturonases from *Moniliophthora perniciosa* are regulated by fermentable carbon sources and possible post-translational modifications. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 60, p. 110–21, nov. 2013.
- BADER, G. D.; HOGUE, C. W. V. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. **BMC Bioinformatics**, v. 4, n. 1, p. 2, 2003.
- BARABÁSI, A.-L. Network science: the Barabási-albert model. **Network Science**, 2015.
- BARABÁSI, A.-L. The Scale-Free Property. **Network Science**, p. 474 pages, 2016.
- BARABÁSI, A.-L.; ALBERT, R. Emergence of Scaling in Random Networks. **Science**, v. 286, n. October, p. 509–512, 1999.
- BARABASI, A. L.; OLTVAI, Z. N. Network Biology: Understanding the Cell's Functional Organization. **Nature Review**, v. 5, n. February, p. 101–113, 2004.
- BASTOS, C N; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology**, n. 1981, p. 306–312, 1985.
- BASTOS, C. N.; ANDEBRHAN, T. In vitro production of basidiospores of *Crinipellis perniciosa*, the causative agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, n. 3, p. 406–409, 1987.
- BAVELAS, A. A Mathematical Model for Group Structures. **Human Organization**, v. 7, n. 3, p. 16–30, 1948.
- BENJAMINI, Y. et al. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. **Behavioural brain research**, v. 125, n. 1–2, p. 279–84, 1 nov. 2001.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Source Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological) Journal of the Royal Statistical Society. Series BMethodological) J. R. Statist. Soc. B**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 14 nov. 1995.

- BICKLE, M. et al. Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. **EMBO Journal**, v. 17, n. 8, p. 2235–2245, 1998.
- BÖLKER, M. *Ustilago maydis* - A valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. **Microbiology**, v. 147, n. 6, p. 1395–1401, 2001.
- BONATTO, D.; NAKAYA, H. T. I. Genômica e Biologia de Sistemas. In: INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (Ed.). . **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações**. Cambridge: Cambridge University Press, 2016. v. 1p. 227–302.
- BORGES, A. C. Total Lipid and Fatty Acid Accumulation During Basidiospore Formation in the Ectomycorrhizal. n. 1, p. 1531–1540, 2008.
- BORKOVICH, KATHERINE A. EBBOLE, D. J. Cellular and molecular biology of filamentous fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 157–158, jan. 2010a.
- BORKOVICH, KATHERINE A. EBBOLE, D. J. Filamentous Fungi. **American Society for Microbiology Press**, v. 9, n. 2, p. 157–158, jan. 2010b.
- BOTSTEIN, D.; CHERVITZ, S. A.; CHERRY, J. M. Yeast as a model organism. **Science (New York, N.Y.)**, v. 277, n. 5330, p. 1259–60, 29 ago. 1997.
- BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, n. 8, p. 799–808, 2006.
- BOYCE, K. J.; A., A. **Morphogenesis: Control of Cell Types and Shape**. [s.l: s.n.].
- BRANDES, U. A faster algorithm for betweenness centrality*. **The Journal of Mathematical Sociology**, v. 25, n. 2, p. 163–177, 2001.
- BRANDES, U.; ERLEBACH, T. **Network Analysis: Methodological Foundations**. [s.l: s.n.]. v. 3418
- BREITLING, R. What is systems biology? **Frontiers in Physiology**, v. 1 MAY, n. May, p. 1–5, 2010.
- BRUN, L. A.; CORFF, J. LE; MAILLET, J. Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species. **Environmental Pollution**, v. 122, p. 361–368, 2003.
- BRYAN A. BAILEY LYNDEL W. MEINHARDT. **Cocoa Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters**. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 101
- BUCHFINK, B.; XIE, C.; HUSON, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p. 59–60, 2014.
- BUSHNELL, B. BBMap : A Fast , Accurate , Splice-Aware Aligner. **LBNL Department of Energy Joint Genome Institute**, p. 3–5, 2014.
- CARDON, C. M. et al. PAS Kinase Promotes Cell Survival and Growth Through Activation of Rho1. **Science Signaling**, v. 5, n. 209, p. ra9-ra9, 2012.
- CASCANTE, M. et al. Metabolic control analysis in drug discovery and disease. **Metabolic control analysis in drug discovery and disease.**, v. 20, n. 3, p. 243–249, 2002.
- CHANG, Y. Y. et al. Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway. **Biochem Soc Trans**, v. 37, n. Pt 1, p. 232–236, 2009.

- CHATR-ARYAMONTRI, A. et al. The BioGRID interaction database: 2017 update. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D369–D379, 2017.
- CLAUSET, A.; NEWMAN, M. E. J.; MOORE, C. Finding community structure in very large networks. p. 1–6, 2004.
- CONESA, A. et al. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674–3676, 2005.
- CRUZ ET AL., 2011. Efecto del Azoxystrobin Sobre Moniliophthora roreri, Agente Causal de la Moniliasis del Cacao (Theobroma cacao). **REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA**, v. 31, p. 65–69, 2013.
- CSÁRDI, G.; NEPUSZ, T. The igraph software package for complex network research. **InterJournal Complex Systems**, v. 1695, p. 1–9, 2006.
- CUI, T. et al. Uncovering new signaling proteins and potential drug targets through the interactome analysis of Mycobacterium tuberculosis. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 118, 2009.
- DA HORA JUNIOR, B. T. et al. Transcriptomics and systems biology analysis in identification of specific pathways involved in cacao resistance and susceptibility to witches' broom disease. **Molecular bioSystems**, v. 8, n. 5, p. 1507–19, abr. 2012.
- DAVID, R. Cell signalling: Rho1 keeps an eye on TORC1. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 5, p. 280–281, 2012.
- DE ARRUDA, M. C. C. et al. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in Crinipellis pernicioso from different geographic origins and hosts. **Mycological research**, v. 107, n. Pt 1, p. 25–37, 2003.
- DELGADO, J. C.; COOK, A. A. Nuclear condition of the basidia, basidiospores, and mycelium of Marasmius perniciosus. **Canadian Journal of Botany**, v. 54, n. 1, p. 66–72, 1976.
- DÍAZ-JIMÉNEZ, D. F. et al. Role of the fungal cell wall in pathogenesis and antifungal resistance. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 4, p. 275–282, 2012.
- DRGONOVA, J. et al. Yeast Protein. v. 272, n. April, p. 1995–1997, 1996.
- DRGONOVÁ, J. et al. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 272, n. 5259, p. 277–279, 1996.
- DÜNKLER, A.; JORDE, S.; WENDLAND, J. An Ashbya gossypii cts2 mutant deficient in a sporulation-specific chitinase can be complemented by Candida albicans CHT4. **Microbiological Research**, v. 163, n. 6, p. 701–710, 2008.
- EL-AKHAL, M. R. et al. Proteomic analysis of conidia germination in Colletotrichum acutatum. **Archives of Microbiology**, v. 195, n. 4, p. 227–246, 2013.
- ENRIGHT, A. J. et al. Protein interaction maps for complete genomes based on gene fusion events. **Nature**, v. 402, n. 6757, p. 86–90, 1999.
- EVANS, B. Y. H. C. Witches' broom disease of cocoa. p. 185–192, 1978.
- EVANS, H. C. Pleomorphism in Crinipellis pernicioso, causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, n. 3, p. 515–523, 1980.
- FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database. **Nucleic acids research**, v. 36, n.

Database issue, p. D281–8, jan. 2008.

FINN, R. D. et al. IPfam: A database of protein family and domain interactions found in the Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 364–373, 2014.

FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D279–D285, 2016.

FLÓREZ, A. F. et al. Protein network prediction and topological analysis in *Leishmania major* as a tool for drug target selection. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 484, 2010.

FONSECA-GARCÍA, C.; LEÓN-RAMÍREZ, C. G.; RUIZ-HERRERA, J. The regulation of different metabolic pathways through the Pal/Rim pathway in *Ustilago maydis*. **FEMS yeast research**, v. 12, n. 5, p. 547–56, ago. 2012.

FREEMAN, L. C. Centrality in Social Networks Conceptual Clarification. **Social Networks**, v. 1, n. 1968, p. 215–239, 1978.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. **Our paths might cross: The role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways** *Eukaryotic Cell*, 2009a.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Our paths might cross: The role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 11, p. 1616–1625, 2009b.

G. ALMEIDDA. Estudo da função biológica da Oxidase Alternativa (AOX) de *Moniliophthora perniciosa* (fungo da vassoura de bruxa) em *Saccharomyces cerevisiae*. 2014.

GARCÍA, R. et al. A novel connection between the Cell Wall Integrity and the PKA pathways regulates cell wall stress response in yeast. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5703, 2017.

GARZÓN, J. I. et al. A computational interactome and functional annotation for the human proteome. **eLife**, v. 5, n. OCTOBER2016, p. 1–27, 2016.

GAVIN, A.-C. et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 141–147, 2002.

GESTEIRA, A. S. et al. Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora perniciosa*. **Annals of botany**, v. 100, n. 1, p. 129–40, jul. 2007.

GLADFELTER, A. S. et al. Septin ring assembly involves cycles of GTP loading and hydrolysis by Cdc42p. **Journal of Cell Biology**, v. 156, n. 2, p. 315–326, 2002.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy : cellular and molecular mechanisms. **The Journal of Pathology**, v. 221, n. 1, p. 3–12, 2010.

GOMES, D. S. et al. Mycelial development preceding basidioma formation in *Moniliophthora perniciosa* is associated to chitin, sugar and nutrient metabolism alterations involving autophagy. **Fungal Genetics and Biology**, v. 86, p. 33–46, 2016.

GRIFFITH, G. W. et al. Witches' brooms and frosty pods: Two major pathogens of cacao. **New Zealand Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p. 423–435, 2003.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis perniciosa* using a bran-vermiculite medium. v. 99, p. 227–230, 1993.

- GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipeiis*. v. 72, n. August 1993, p. 278–289, 1994.
- GU, Z.; EILS, R.; SCHLESNER, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics**, v. 32, n. 18, p. 2847–2849, 2016.
- GUARRO, J.; PIETRO, A. DI. Rho1 has distinct functions in morphogenesis, cell wall biosynthesis and virulence of. v. 10, n. February, p. 1339–1351, 2008.
- HARRINGTON, E. D.; JENSEN, L. J.; BORK, P. Predicting biological networks from genomic data. **FEBS Letters**, v. 582, n. 8, p. 1251–1258, 2008.
- HE, F. et al. The prediction of protein-protein interaction networks in rice blast fungus. **BMC genomics**, v. 9, p. 519, 2008.
- HEDGER, J. N.; PICKERING, V.; ARAGUNDI, J. Variability of populations of the witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicios*a). **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, n. 4, p. 533–546, 1987.
- HERMJAKOB, H. et al. IntAct: an open source molecular interaction database. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, n. Database issue, p. D452-5, 2004.
- HO, Y. et al. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 180–183, 10 jan. 2002.
- HUYNEN, M. A.; BORK, P. Measuring genome evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 11, p. 5849–5856, 1998.
- IANIRI, G.; INDRUM, AL. Essential Gene Discovery in the Basidiomycete *Cryptococcus neoformans* for Antifungal Drug Target Prioritization. **mBio**, v. 6, n. 2, p. 1–18, 2015.
- ISSERLIN, R.; EL-BADRAWI, R. A.; BADERY, G. D. The biomolecular interaction network database in PSI-MI 2.5. **Database**, v. 2011, n. May, p. 1–16, 2011.
- ITO, T. et al. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 8, p. 4569–74, 2001.
- JAFFE, A. B.; HALL, A. Rho GTPases: Biochemistry and Biology. p. 247–272, 2005.
- JEONG, H. et al. The large scale organization of metabolic networks. **Nature**, v. 407, n. 6804, p. 651–654, 2000.
- JEONG, H. et al. Lethality and centrality in protein networks. **Nature**, v. 411, n. 6833, p. 41–42, 2001.
- JONES, A. M. et al. Border Control--A Membrane-Linked Interactome of *Arabidopsis*. **Science**, v. 344, n. 6185, p. 711–716, 2014.
- KANEKO; ISHII, 2015. Effect of azoxystrobin on activities of antioxidant enzymes and alternative oxidase in wheat head blight pathogens... **J Gen Plant Pathol**, v. 75, n. January, p. 388–398, 2015.
- KELEKAR, A. Autophagy. v. 271, p. 259–271, 2005.
- KESHAVA PRASAD, T. S. et al. Human Protein Reference Database - 2009 update. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 767–772, 2009.

- KHURI, S.; WUCHTY, S. Essentiality and centrality in protein interaction networks revisited. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2015.
- KIM, J.-G. et al. Predicting the interactome of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* for target selection and DB service. **BMC bioinformatics**, v. 9, p. 41, 2008.
- KITAMURA, A. et al. Discovery of a Small-Molecule Inhibitor of -1,6-Glucan Synthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 670–677, 1 fev. 2009.
- KLIONSKY, D. J. Autophagy: From phenomenology to molecular understanding in less than a decade. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 11, p. 931–937, 2007.
- KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 185–202, 2006.
- KOKKELINK, L. et al. The small GTPase BcCdc42 affects nuclear division, germination and virulence of the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 11, p. 1012–1019, 2011.
- KURTZ, M. B.; REX, J. H. Glucan synthase inhibitors as antifungal agents. **Advances in Protein Chemistry**, v. 56, p. 423–475, 2001.
- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, 2012.
- LEE, I. et al. A single gene network accurately predicts phenotypic effects of gene perturbation in *Caenorhabditis elegans*. **Nature genetics**, v. 40, n. 2, p. 181–8, 2008.
- LEVIN, D. E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. **Genetics**, v. 189, n. 4, p. 1145–1175, 2011.
- LEVINE, B. et al. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. **Developmental cell**, v. 6, n. 4, p. 463–77, 2004.
- LICATA, L. et al. MINT, the molecular interaction database: 2012 Update. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. 857–861, 2012.
- LIN, M. et al. The Predicted Arabidopsis Interactome Resource and Network Topology-Based Systems Biology Analyses. **The Plant Cell**, v. 23, n. 3, p. 911–922, 2011.
- LIU, J.; BALASUBRAMANIAN, M. K. 1,3-beta-Glucan synthase: a useful target for antifungal drugs. **Current drug targets. Infectious disorders**, v. 1, n. 2, p. 159–69, 2001.
- LIU, S. et al. A computational interactome for prioritizing genes associated with complex agronomic traits in rice (*Oryza sativa*). **The Plant Journal**, v. 90, n. 1, p. 177–188, abr. 2017.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.
- LOCKSHON, D. et al. Rho Signaling Participates in Membrane Fluidity Homeostasis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–10, 2012.
- LOEWITH, R. et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. **Molecular Cell**, v. 10, n. 3, p. 457–468, 2002.
- LOEWITH, R.; HALL, M. N. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth

- control. **Genetics**, v. 189, n. 4, p. 1177–1201, 2011.
- MADDEN, K.; SNYDER, M. Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. p. 687–744, 1998.
- MAERE, S.; HEYMANS, K.; KUIPER, M. BiNGO: A Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3448–3449, 2005.
- MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D222–D226, 2015.
- MARCOTTE, E. M. et al. Detecting Protein Function and Protein-Protein Interactions from Genome Sequences. **Science (New York, N.Y.)**, v. 285, n. 5428, p. 751–753, 2014.
- MARELLI, J. et al. Infection Biology of *Moniliophthora perniciosa* on *Theobroma cacao* and Alternate Solanaceous Hosts. p. 149–160, 2009.
- MARES, J. H. et al. Protein profile and protein interaction network of *Moniliophthora perniciosa* basidiospores. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 120, 2016a.
- MARES, J. H. et al. Protein profile and protein interaction network of *Moniliophthora perniciosa* basidiospores. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 120, 2016b.
- MARES, J. H. et al. Proteomic analysis during of spore germination of *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease in cacao. p. 1–10, 2017.
- MATTHEWS, L. R. et al. Identification of Potential Interaction Networks Using Sequence-Based Searches for Conserved Protein-Protein Interactions or ' ' Interologs ' ' Identification of Potential Interaction Networks Using Sequence-Based Searches for Conserved Protein-Protein Inte. **Genome Research**, p. 2120–2126, 2001.
- MCCANN, M. P.; SNETSELAAR, K. M. A genome-based analysis of amino acid metabolism in the biotrophic plant pathogen *Ustilago maydis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. SUPPL. 1, p. 77–87, 2008.
- MEINHARDT, L. W. et al. In Vitro Production of Biotrophic-Like Cultures of *Crinipellis perniciosa* , the Causal Agent of Witches Õ Broom Disease of *Theobroma cacao*. v. 52, p. 191–196, 2006.
- MEINHARDT, L. W. et al. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: What's new from this old foe? **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 5, p. 577–588, 2008.
- MELO, S. C. et al. Altered phenotypes in *saccharomyces cerevisiae* by heterologous expression of basidiomycete *moniliophthora perniciosa* SOD2 gene. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 12324–12344, 2015.
- MONDEGO ET AL., 2008. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. **BMC Genomics**, v. 25, p. 1–25, 2008.
- MORENO-HAGELSIEB, G.; LATIMER, K. Choosing BLAST options for better detection of orthologs as reciprocal best hits. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 24, n. 3, p. 319–24, 1 fev. 2008.
- NAIR, U. et al. SNARE proteins are required for macroautophagy. **Cell**, v. 146, n. 2, p. 290–302, 2011.

- NEIMAN, A. M. Ascospore Formation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 69, n. 4, p. 565–584, 2005.
- NEWMAN, M. E. J. Fast algorithm for detecting community structure in networks. n. 2, p. 1–5, 2003.
- NOIR, S. et al. A proteomic analysis of powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) conidiospores. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 2, p. 223–236, 2009.
- NONAKA, H. et al. A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO journal**, v. 14, n. 23, p. 5931–5938, 1995.
- OGATA, H. et al. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 1, p. 29–34, 1999.
- OH, Y. T. et al. Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, n. 3, p. 246–253, 2010.
- OLIVEIRA; LUZ, 2005. **Identificação e Manejo das Principais Doenças do Cacaueiro no Brasil**. [s.l: s.n.].
- ONISHI, J. et al. Discovery of novel antifungal (1,3)-beta-D-glucan synthase inhibitors. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 368–377, 2000.
- OZAKI, K. et al. Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO journal**, v. 15, n. 9, p. 2196–207, 1996.
- P. ERDÖS, A. R. The Evolution of Random Graphs. **Transactions of the American Mathematical Society**, v. 286, n. 1, p. 257, 1984.
- PARK, D. et al. Comparative interactomics analysis of protein family interaction networks using PSIMAP (protein structural interactome map). **Bioinformatics**, v. 21, n. 15, p. 3234–3240, 2005.
- PEARSON, W. R. An introduction to sequence similarity (“homology”) searching. **Current Protocols in Bioinformatics**, n. SUPPL.42, p. 1–8, 2013.
- PEREZ, P.; RINCÓN, S. A. Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. **Biochemical Journal**, v. 426, n. 3, p. 243–253, 2010.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e–45, 2001.
- PHIZICKY, E. M.; FIELDS, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 94–123, 1995.
- PICKERI; HEDGER, 1987. PRODUCTION OF BASIDIOCARPS OF THE COCOA PATHOGEN *CRINIPPELLIS PERNICIOSA* IN IN VITRO CULTURE. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 25, p. 2–4, 1987.
- PINTO, L. R. M.; PIRES, J. L. Seleção de plantas de cacau resistentes à vassoura-de-bruxa. p. 35 p (Boletim Técnico No 181), 1998.
- PIRES, A. B. L. et al. Early development of *Moniliophthora perniciosa* basidiomata and

- developmentally regulated genes. **BMC microbiology**, v. 9, p. 158, 2009.
- PLOETZ, R. C. Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1634–1639, 2007.
- PLOTNIKOV, A. et al. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 9, p. 1619–1633, 2011.
- POLLACK, J. K.; HARRIS, S. D.; MARTEN, M. R. Autophagy in filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 1, p. 1–8, 2009.
- POLONI, J. DE F. et al. *Biologia de Sistemas*. p. 116–146, 2014.
- POWELL, J. F.; STRANGE, R. E. Biochemical changes occurring during the germination of bacterial spores. **The Biochemical journal**, v. 54, n. 2, p. 205–9, 1953.
- PUNGARTNIK, C. et al. Reactive oxygen species and autophagy play a role in survival and differentiation of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 6–7, p. 461–472, 2009a.
- PUNGARTNIK, C. et al. High-Affinity Copper Transport and Snq2 Export Permease of *Saccharomyces cerevisiae* Modulate Cytotoxicity of PR-10 from *Theobroma cacao*. **Society**, v. 22, n. 1, p. 39–51, 2009b.
- PURDY; DICKSTEIN, 1990. **Basidiocarp development on mycelial mats of *Crinipellis perniciosa***, 1990.
- PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. STATUS OF CACAO WITCHES' BROOM: biology, epidemiology, and management. **Annual review of phytopathology**, v. 34, p. 573–594, 1996.
- QADOTA. identification of Yeast Rho1 p GTPase as a Regulatory Subunit of 1,3-P-Glucan Synthase. **Science**, v. 272, n. April, p. 279–281, 1996.
- QI, Y.; NOBLE, W. S. Protein interaction networks: Protein domain interaction and protein function prediction. **Handbook of Statistical Bioinformatics**, p. 427–459, 2011.
- REZENDE, A. M. et al. Computational Prediction of Protein-Protein Interactions in *Leishmania* Predicted Proteomes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.
- REZENDE, A. M. Predição Computacional de Interações de Proteína- Proteína em Proteomas Preditos de. 2012.
- RIVALS, I. et al. Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: Which test? **Bioinformatics**, v. 23, n. 4, p. 401–407, 2007.
- ROLLIN-PINHEIRO, R. et al. Sphingolipids as targets for treatment of fungal infections. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1469–1484, 2016.
- SAADATPOUR, A.; ALBERT, R. Boolean modeling of biological regulatory networks: A methodology tutorial. **Methods**, v. 62, n. 1, p. 3–12, 2013.
- SANTOS, R. X.; BRENDDEL, M.; PUNGARTNIK, C. Carbon source-dependent variation of acquired mutagen resistance of *Moniliophthora perniciosa* : Similarities in natural and artificial systems. v. 45, p. 851–860, 2008.
- SATO, T. et al. The inference of protein-protein interactions by co-evolutionary analysis is

improved by excluding the information about the phylogenetic relationships. **Bioinformatics**, v. 21, n. 17, p. 3482–3489, 2005.

SAUER U., H. M.; ZAMBONI, N. Getting Closer to the Whole Picture. **Science**, v. 316, n. 5824, p. 550–551, 2007.

SCARPARI, L. M. et al. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicios*a. v. 56, n. 413, p. 865–877, 2005.

SCHMELZLE, T.; HALL, M. N. TOR, a central controller of cell growth. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 253–262, 2000.

SCHMIDT, A.; SCHMELZLE, T.; HALL, M. N. The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1433–1441, 2002.

SCHWEIZER, M. et al. The pentafunctional FAS1 gene of yeast: its nucleotide sequence and order of the catalytic domains. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 203, n. 3, p. 479–486, 1986.

SCOTT, J. **Social network analysis: A handbook** SAGE Publications, 2000. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Social+Network+Analysis+A+Handbook#6>>

SENA, K.; ALEMANNO, L.; GRAMACHO, K. P. The infection process of *Moniliophthora pernicios*a in cacao. **Plant Pathology**, v. 63, n. 6, p. 1272–1281, 2014a.

SENA, K.; ALEMANNO, L.; GRAMACHO, K. P. The infection process of *Moniliophthora pernicios*a in cacao. **Plant Pathology**, 2014b.

SHENG ZHAO; FERNALD, R. D. Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. v. 12, n. 8, p. 1047–1064, 2009.

SHERTZ, C. A et al. Conservation, duplication, and loss of the Tor signaling pathway in the fungal kingdom. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 510, 2010.

SHIN, K. S. et al. Differential roles of the chitinase in autolysis and cell death of *Aspergillus nidulans*. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 5, p. 738–746, 2009.

SHOJI, J. YA; KIKUMA, T.; KITAMOTO, K. Vesicle trafficking, organelle functions, and unconventional secretion in fungal physiology and pathogenicity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 20, p. 1–9, 2014.

SILVA, F. A. C. et al. Proteomic response of *Moniliophthora pernicios*a exposed to pathogenesis-related protein-10 from *Theobroma cacao*. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4855–4868, 2013.

SKRABANEK, L. et al. Computational prediction of protein-protein interactions. **Molecular Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 1–17, 2008.

SREENIVASAN, T. N.; DABYDEEN, S. **Modes of Penetration of Young Cocoa Leaves by *Crinipellis pernicios*a**, 1978.

STEINBERG, G.; PEREZ-MARTIN, J. *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. **Trends in Cell Biology**, v. 18, n. 2, p. 61–67, 2008.

- SUDBERY. Regulation of polarised growth in fungi. **fungal biology reviews**, v. 22, p. 44–55, 2008.
- SZKLARCZYK, D. et al. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D447–D452, 2015.
- TAPON, N.; HALL, A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 1, p. 86–92, 1997.
- TEIXEIRA, P. J. P. L. et al. High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Cell**, v. 26, n. 11, p. 4245–4269, 2014.
- THOMAZELLA. The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. p. 1025–1034, 2012.
- VALDIVIESO, M. H. et al. Chitin synthesis in a gas1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 17, p. 4752–4757, 2000.
- VILLELA-DIAS, C. et al. Nep1-like protein from *Moniliophthora perniciosa* induces a rapid proteome and metabolome reprogramming in cells of *Nicotiana benthamiana*. **Physiologia Plantarum**, v. 150, n. 1, p. 1–17, 2014.
- VON MERING, C. et al. STRING: Known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. DATABASE ISS., p. 433–437, 2005.
- WANG, Y. et al. AIM: A comprehensive Arabidopsis interactome module database and related interologs in plants. **Database**, v. 2014, p. 1–8, 2014.
- WEBER, M. et al. Ectopic expression of a constitutively active Cdc42 small GTPase alters the morphology of haploid and dikaryotic hyphae in the filamentous homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 7, p. 624–637, 2005.
- WILSON, R. A. et al. Towards Defining Nutrient Conditions Encountered by the Rice Blast Fungus during Host Infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–9, 2012.
- WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real Time for mRNA quantitation. v. 39, n. 1, p. 1–11, 2005.
- WULLSCHLEGER, S. et al. Molecular organization of target of rapamycin complex 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 35, p. 30697–30704, 2005.
- XENARIOS, I. DIP, the Database of Interacting Proteins: a research tool for studying cellular networks of protein interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 303–305, 2002.
- XIWEI ZHENG, CONG BI, MARISSA BROOKS, AND D. S. H. Sphingolipid Signaling in Fungal Pathogens. **Anal Chem.**, v. 25, n. 4, p. 368–379, 2015.
- XU, K. et al. Path lengths in protein-protein interaction networks and biological complexity. **Proteomics**, v. 11, n. 10, p. 1857–1867, 2011.
- YAMAUCHI, N. et al. Chlorophyll degradation in Wase satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit with on-tree maturation and ethylene treatment. **Scientia Horticulturae**, v. 71, n. 1–2, p. 35–42, nov. 1997.
- YAN, G.; LAI, Y.; JIANG, Y. The TOR Complex 1 Is a Direct Target of Rho1 GTPase. **Molecular Cell**, v. 45, n. 6, p. 743–753, 2012.

YU, H. et al. Annotation Transfer Between Genomes : Protein – Protein Interologs and Protein – DNA Regulogs. **Genome Research**, p. 1107–1118, 2004.

YU, H. et al. The importance of bottlenecks in protein networks: Correlation with gene essentiality and expression dynamics. **PLoS Computational Biology**, v. 3, n. 4, p. 713–720, 2007.

ZHANG, F. et al. Genome-wide inference of protein interaction network and its application to the study of crosstalk in Arabidopsis abscisic acid signaling. **Plant Physiology**, v. 171, n. June, p. pp.00057.2016, 2016.