

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



Caracterização *in silico* da interação da TcPR-10 mutante com proteínas de
***Moniliophthora perniciosa* e transformação genética de planta modelo com**
TcPR-10 mutante

NATASHA DOS SANTOS LOPES

ILHÉUS - BAHIA - BRASIL

Fevereiro de 2018

NATASHA DOS SANTOS LOPES

**Caracterização *in silico* da interação da TcPR-10 mutante com proteínas de
Moniliophthora perniciosa e transformação genética de planta modelo com
TcPR-10 mutante**

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

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

ILHÉUS - BAHIA - BRASIL

Fevereiro de 2018

L864

Lopes, Natasha dos Santos.

Caracterização in silico da interação da TcPR-10 mutante com proteínas de *Moniliophthora perniciosa* e transformação genética de planta modelo com TcPR-10 mutante / Natasha dos Santos Lopes. – Ilhéus, BA: UESC, 2018.

xvii, 92f. : il.

Orientadora: Fabienne Micheli

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – PPGGBM
Inclui referências.

1. Vassoura-de-bruxa (Fitopatologia). 2. Interação celular. 3. Transporte. 4. Plantas transgênicas. 5. Resistência. I. Título.

CDD 632.4

NATASHA DOS SANTOS LOPES

Caracterização *in silico* da interação da TcPR-10 mutante com proteínas de *Moniliophthora perniciosa* e transformação genética de planta modelo com TcPR-10 mutante

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

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

APROVADA:

Dr^a Amanda Ferreira da Silva Mendes
(IFBA)

Dr^a Fátima Cerqueira Alvim
(UESC)

Dr Juliano Oliveira Santana
(UESC)

Dr^a Fabienne Micheli
(CIRAD/UESC Orientadora)

DEDICO:

Aos meus Pais, Dinaldo e Silvana e a minha irmã Priscilla, em retribuição aos seus esforços.

AGRADECIMENTOS

O mestrado se traduz em trabalho árduo, muito estudo, noites sem dormir, preocupações e ansiedade, mas também em muito aprendizado, amadurecimento e crescimento pessoal. Toda essa jornada não forma apenas pesquisadores, nos ensina também a como sermos mais humanos. Se soubermos aproveitar o caminho, sairemos dessa turbulência ainda melhores. Há muitas pessoas a quem devo todas as minhas experiências nesses dois anos, e agora eu quero agradecer...

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e o Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGGBM), pelo apoio e oportunidade de realizar o curso.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

À minha orientadora Dr. Fabienne Micheli, pelo exemplo profissional e conhecimento compartilhado, por toda confiança depositada em mim, pelas palavras de apoio em momentos decisivos e por sempre estar disposta a ouvir minhas contribuições. Deixo aqui registrado todo o meu respeito e gratidão.

Ao professor Bruno Andrade, fundamental na etapa das análises de bioinformática, sempre muito disposto a colaborar (inclusive nas férias). Grande profissional, com uma humildade sem tamanho.

Ao professor Márcio Costa por sua simplicidade, humanidade e constante acolhimento para tirar dúvidas ou contribuir de algum modo com o minha pesquisa e crescimento profissional.

À Sara Menezes pelo apoio na elaboração do projeto, desenvolvimento inicial e dúvidas fundamentais tiradas pelo Whatsapp ou e-mail durante esses dois anos.

Aos pesquisadores Amanda Mendes, Juliano Santana, Fátima Alvim, Valter Magalhães e Luciana Camilo, por aceitarem o convite para compor a banca examinadora da minha dissertação e por contribuírem para melhorar a qualidade deste trabalho.

À todos os professores do programa por todo conhecimento compartilhado, seja nas disciplinas, nas suas salas ou nos corredores do CBG.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular por deixarem o ambiente de trabalho mais descontraído e por todo tipo de colaboração, em especial Thiago, Monique e Aline.

Às funcionárias do colegiado, Mara e em especial Fabrícia, por sua eficiência em tirar as nossas dúvidas e pela preocupação em sempre ajudar.

Aos meus irmãos de orientação Raner e Edson, por aguentarem meus lamentos e gastarem um pouco do seu valioso tempo na minha etapa de qualificação. A vocês eu desejo todo sucesso, VOCÊS SÃO FANTÁSTICOS!

À Ákyla pelas ajudas com o *Discovery Studio* e pela troca de experiências.

À todos os colegas do CBG, que de algum modo contribuíram para essa jornada, seja emprestando suas experiências, reagentes, protocolos ou pelas gargalhadas no final do corredor do CBG, nas confraternizações de São João e fim de ano ou no labin. Em especial a Luana, Grazi, MaLu, Horlei, Lidianne, Thaise Anne, Dona Jô e Fernanda.

Ao meu bonde pesadão (Bonde qualis A1) sempre presente no grupo de estudos em Denilson as sextas. Obrigada por deixarem o caminho mais divertido. Agradeço especialmente a Ary e Leti pela amizade firmada e pelas acolhidas em Itabuna.

À Thay, por ouvir minhas ideias e por ser tão divertida e sempre me receber com esse abraço aconchegante. Muito obrigada pelas diversas risadas improváveis que você tirou de mim e pelo apoio diário nessa jornada.

À Jona por ser esse ser iluminado, cheio de ideias, cheio de energia e cheio de amor. Amigo, obrigada por todas as trocas que tivemos, por se tornar uma das pessoas que eu mais aprecio na vida, por ser essa imensidão de amor, liberdade e sede de conhecimento. Amo você!

À Adrielle, Laize e Amanda por desde o início estarem me apoiando quando o mestrado era apenas um sonho. Por todas as maratonas de focação e por sempre se alegrarem com minhas conquistas. Um agradecimento especial a minha

amiga/irmã Adrielle, com quem sempre posso contar. Peço desculpas pelas minhas ausências em alguns períodos desses dois anos.

À Thaís que foi minha maior parceria nesses dois anos. Obrigada por se dispor a me ajudar em qualquer, LITERALMENTE qualquer situação. Me dar sua casa pra morar (sem pagar aluguel) e um pedaço da sua cama para dormir, só pra eu não ter que sair do Brooklyn e passar mil horas dentro de um ônibus. Por todos os almoços, lanches, shoppings, momentos no bosque, viradas de noite (que eu nunca cumpria) para estudar, caronas, empréstimos, festas e principalmente por sua amizade de 24 anos. Vai ser muito estranho não ter mais você por perto. Amo você Funquinho!

À minha família por todo amor, carinho, incentivo, paciência e colaboração. Eu não seria nada sem vocês. Obrigada por serem o bem mais precioso da minha vida. Aos meus Pais agradeço por todo tipo de suporte que pode existir e a minha irmã, agradeço pela atenção diária, por todas as ajudinhas de custo, por fingir entender meu projeto só para compreender minhas angústias e por sempre estar ali, quando ninguém mais está.

À DEUS, por me dar a vida, me conduzir e não me deixar sozinha nos momentos de angústia, ansiedade e aflição, sempre me mostrando que todo o esforço vale a pena, que no final a Sua vontade prevalece e que toda experiência é válida e traz algo bom consigo.

Nunca reclamar, só agradecer, tudo que vier eu fiz por merecer...

ÍNDICE

EXTRATO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 A vassoura-de-bruxa do cacaueiro.....	4
2.1.2 Um breve histórico	4
2.1.2 Descrição da biologia da interação <i>Theobroma cacao</i> - <i>Moniliophthora perniciosa</i>	5
2.2 Proteínas PR- relacionadas a defesa da planta contra patógenos	11
2.3 Proteínas relacionadas à patogênese – PR-10	14
2.4 Proteínas <i>Heat Shock</i> -modo de ação	17
2.5 Transportadores de membrana ABC- ABCG/Snq2.....	19
REFERÊNCIAS	20
3. CAPÍTULO 1. Caracterização <i>in silico</i> da interação TcPR-10mut- <i>Moniliophthora perniciosa</i> : transporte e mecanismos de defesa do patógeno	30
4. CAPÍTULO 2. Transformação genética de planta modelo com gene <i>TcPR-10mut</i> endereçado ao apoplasto	5
CONCLUSÕES GERAIS.....	73

EXTRATO

Lopes, Natasha dos Santos. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro 2018. In silico characterization of the interaction of mutant TcPR-10 with proteins of *Moniliophthora perniciosa* and genetic transformation of plant model with mutant *TcPR-10*. **Orientadora:** Dra Fabienne Micheli (CIRAD/UESC). **Co-orientadores:** Sara Pereira Menezes (UESC) e Marcio Gilberto Cardoso Costa (UESC).

Palavras-chave: vassoura-de-bruxa, interação, transporte, planta transgênica, resistência.

A doença vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo basidiomicota hemibiotrófico *Moniliophthora perniciosa* é a causa principal do declínio na produção de cacau na região Sul da Bahia. Esse fungo apresenta duas fases distintas em seu ciclo de vida. Na fase parasítica (biotrófica) o fungo monocariótico coloniza o apoplasto de onde obtém nutrientes. Com a progressão da interação é desenvolvido o micélio dicariótico que invade o conteúdo intracelular da planta causando a morte do tecido, caracterizando a fase saprofítica (necrotrófica). Várias alternativas e métodos vem sendo desenvolvidos na tentativa de controlar a doença, dentre elas, estudos moleculares são importantes ferramentas para o entendimento da biologia desse patossistema. O gene *TcPR-10* foi identificado a partir de uma biblioteca de interação *Theobroma cacao-M. perniciosa*. A proteína expressa por esse gene é citoplasmática e possui atividade de ribonuclease e antifúngica, atuando durante a fase necrotrófica da interação. No entanto, a TcPR-10 possui semelhanças estruturais a proteínas alergênicas encontradas em grãos de pólen. Recentemente foram realizadas mutações nessa proteína (TcPR-10mut) que diminuíram seu potencial alergênico, sem interferência nas suas características de interesse biotecnológico. Sendo portanto, uma biomolécula alvo com potencialidade de ser usada em estudos moleculares e transformação genética de plantas. Desse modo, esse estudo teve como objetivos: i) caracterizar *in silico* o comportamento da TcPR-10mut na interação com *M. perniciosa*; e ii) transformar plantas modelo com o gene *TcPR-10mut* associado a um peptídeo signal visando o seu endereçamento ao espaço extracelular. Um estudo envolvendo a interação da TcPR-10 com *M. perniciosa* mostrou aumento na expressão de proteínas *Heat Shock* e oxiredutases. Outros estudos que incluíram a *Saccharomyces cerevisiae* indicaram que a atividade antifúngica e internalização da TcPR-10 parece estar relacionada a permeases e transportadores de membrana Snq2. O *docking* da TcPR-10mut com proteínas *Heat Shock* (HSP82 e HslU) e o transportador de membrana Snq2 permitiu caracterizar *in silico* a interação entre essas proteínas. O complexo formado por TcPR-10mut com as proteínas *Heat Shock* indicam uma tentativa de bloquear as funções da TcPR-10mut, já que a interação ocorre no seu sítio ativo e cavidade hidrofóbica. Em contrapartida a TcPR-10mut também tenta inibir a HSP82 interagindo com o seu sítio de ligação. Sugere-se que essa interação pode estar funcionando como um mecanismo de sinalização da célula fúngica a mudanças no ambiente celular que podem responder aumentando a expressão de proteínas de desintoxicação. A

interação da TcPR-10mut com o domínio transmembrana de Snq2 de *S. cerevisiae*, indica uma relação da internalização dessa proteína com esses transportadores de membrana, sugerindo que esse transporte pode estar ocorrendo de forma semelhante ao transporte de alcaloides, devido as duas proteínas serem relacionadas ao transporte desse componente, que está relacionado a composição da membrana celular. As plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom), transformadas via *Agrobacterium tumefaciens*, com o gene *TcPR-10mut* endereçado ao apoplasto clonado no vetor *pCAMBIA 2301* sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S, na orientação senso permitirá a caracterização funcional desse gene na interação com *M. pernicioso*, nos estágios iniciais da doença. Em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo permitem dizer que TcPR-10mut é uma importante molécula biotecnológica que pode ser explorada em estudos relacionados ao entendimento e combate da doença vassoura-de-bruxa.

ABSTRACT

Lopes, Natasha dos Santos. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, February, 2018. *In silico* characterization of the interaction of mutant TcPR-10 with proteins of *Moniliophthora perniciosa* and genetic transformation of plant model with mutant *TcPR-10*. **Advisor:** Dra Fabienne Micheli (CIRAD / UESC). **Advisor Committee:** Sara Pereira Menezes (UESC) and Marcio Gilberto Cardoso Costa (UESC).

Key words: witches broom, interaction, transport, transgenic plant, resistance.

The witches broom disease, caused by the hemibiotrophic basidiomycotic fungus *Moniliophthora perniciosa*, is the main cause of the decline in cocoa production in the Southern Region of Bahia. This fungus has two distinct phases in its life cycle. In the parasitic (biotrophic) phase the monocariotic fungus colonizes the apoplast from which it obtains nutrients. With the progression of the interaction the dicariotic mycelium grows and invades the intracellular content of the plant causing the death of the tissue, characterizing the saprophytic (necrotrophic) phase. Several alternatives and methods have been developed to control the disease; among them molecular studies are important tools for understanding the biology of this patosystem. The *TcPR-10* gene was identified from a *Theobroma cacao*-*M. perniciosa* interaction library. The corresponding protein is cytoplasmic and has ribonuclease and antifungal activities, acting during the necrotrophic phase of the interaction. However, the TcPR-10 has structural similarities to allergenic proteins found in pollen grains. Mutations in this protein have recently been made (TcPR-10mut) that reduced its allergenic potential without interference in its biotechnological characteristics. Therefore, it is a target biomolecule with the potential to be used in molecular studies and genetic transformation of plants. Thus, this study aimed: i) to characterize *in silico* the behavior of TcPR-10mut in the interaction with *M. perniciosa*; and ii) to transform model plants with the *TcPR-10mut* gene associated to a signal peptide aiming its addressing to the extracellular space. A study involving the interaction of TcPR-10 with *M. perniciosa* showed increased expression of Heat Shock proteins and oxireductases. Other studies including *Saccharomyces cerevisiae* have indicated that the antifungal activity and internalization of TcPR-10 appeared to be related to Snq2 membrane permeates and transporters. The TcPR-10mut docking with Heat Shock proteins (HSP82 and HslU) and the Snq2 membrane transporter allowed characterizing *in silico* the interaction between these proteins. The complex formed by TcPR-10mut with Heat Shock proteins indicates the possibility to block the functions of TcPR10mut, since the interaction occurs in its active site and hydrophobic cavity. In contrast, TcPR-10mut also attempts to inhibit HSP82 by interacting with its binding site. It could be suggested that this interaction may act as a fungal cell signaling mechanism in response to changes in the cellular environment that may respond by increasing the expression of detoxification

proteins. The interaction of TcPR-10mut with the *S. cerevisiae* Snq2 transmembrane domain, indicates a relation of the internalization of this protein with these membrane transporters, suggesting that this transport may occur in a similar way to the transport of alkaloids, once the two proteins are related to the transport of this component, which is related to the composition of the cell membrane. Tomato plants (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom), transformed via *Agrobacterium tumefaciens* with the *TcPR-10mut* gene targeted to the apoplast in the pCAMBIA 2301 vector under the control of the constitutive promoter CaMV35S, in the sense orientation will allow the functional characterization of this gene in the interaction with *M. perniciosa* in the early stages of the disease. Together, the results obtained in the present study allow saying that TcPR-10mut is an important biotechnological molecule that can be explored in studies related to the understanding and combat of witches broom disease.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Progressão da doença vassoura-de-bruxa (da esquerda para a direita), desde a fase biotrófica (em cima) até a necrotrófica (em baixo). Estruturas miceliais típicas e número de núcleos por esporo em cada estágio sintomático mostrado. O basidioma libera os basidiósporos que Infectam o tecido vegetal por penetração através da abertura estomática. As hifas se desenvolvem ocorrendo o aparecimento da vassoura verde. A fase necrotrófica se caracteriza pelo desenvolvimento dos grampos de conexão causando a necrose de tecidos infectados levando a formação da vassoura seca, basidiocarpos e por fim, esporos. Adaptado (Meinhardt et al., 2008; Sena et al., 2014) 8

Figura 2: Estrutura tridimensional de TcPR-10 obtida por modelagem de homologia com Pru av1 (Protein Data Bank, 1e09_A). **A.** Elementos da estrutura secundária de TcPR-10: alfa hélice em vermelho; folhas beta em amarelo e P loops em verde. **B.** Superfície molecular de TcPR-10 selvagem com regiões correspondentes de aminoácidos contíguos: 47GDGGVG52 em azul; 59FPEGSHFKY67 em marrom; 116TSHYHT121 em cinza; 129EEEEKKK136 em pêssego. **C e E.** Superfície molecular do tipo selvagem TcPR-10 com aminoácidos para mutações destacadas em laranja (Thr10, Ile30, His45). **D e F.** TcPR-10 tipo mutante com mutações pontuais em azul (Pro10, Val30, Ser45). Fonte: Menezes et al. (2012). 17

CAPÍTULO 1

Figura 1: Estrutura tridimensional de TcPR-10mut obtida por modelagem de homologia com Pru av1 disponível no RCSB Protein Data Bank (PDB: 1e09_A) (MENEZES et al., 2012). **A.** Elementos estruturais. As alfa hélices estão representadas em vermelho e as folhas beta em azul. **B.** Superfície molecular da TcPR-10mut indicando regiões com graus de hidrofobicidade: baixos níveis de hidrofobicidade em azul e altos níveis de hidrofobicidade em marrom. A seta indica a cavidade hidrofóbica da proteína 38

Figura 2: Estrutura tridimensional da HSP82 obtida no RCSB Protein Data Bank (PDB: 4CE3). **A.** Elementos que compõem a estrutura. As alfa hélices estão indicadas em vermelho e as folhas beta em azul. **B.** Superfície molecular da HSP82 indica regiões com baixos níveis de hidrofobia em azul e altos níveis de hidrofobia em marrom; seta indica a cavidade hidrofóbica da proteína..... 39

Figura 3: Estrutura tridimensional da HslU obtida no RCSB Protein Data Bank (PDB: 1OFI). **A.** Elementos estruturais: alfa hélices estão representadas em vermelho e folhas beta em azul. **B.** Superfície molecular da HslU indicando regiões com graus de hidrofobicidade: baixos níveis de hidrofobicidade em azul e altos

níveis de hidrofobicidade em marrom; seta indica a cavidade hidrofóbica da proteína 39

Figura 4: Resultado da análise de interação entre proteínas TcPR-10mut e HSP82 por Docking. **A.** Superfície molecular com proteínas complexadas; TcPR-10mut indicada em azul (receptor) e HSP82 indicada em rosa (ligante). **B.** Representação dos resíduos de aminoácidos onde ocorreu interação 40

Figura 5: Resultado da análise de interação entre proteínas TcPR-10mut e HslU por Docking. **A.** Superfície molecular com proteínas complexadas; TcPR-10mut indicada em roxo (receptor) e HslU indicada em verde (ligante). **B.** Representação dos resíduos de aminoácidos onde ocorreu interação 41

Figura 6: Alinhamento de sequências de aminoácidos da Snq2 de Saccharomyces cerevisiae com transportadores de membrana ABC, feita pelo ClustalW. **A.** Alinhamento com domínio 1 do transportador de membrana ABCG. **B.** Alinhamento com domínio 2 do transportador de membrana ABCG 43

Figura 7: Representação do modelo tridimensional do domínio 1 do transportador ABC Snq2. **A.** Modelo 3-D do domínio 1 da proteína Snq2; Em amarelo está representado o domínio citoplasmático e em vermelho o domínio transmembrana da proteína. **B.** Superfície molecular hidrofóbica; níveis mais elevados de marrom indicam regiões mais hidrofóbicas e níveis da coloração em azul indicam regiões menos hidrofóbicas. A seta indica a região com maior nível de hidrofobicidade 43

Figura 8: Representação do modelo tridimensional do domínio 2 do transportador ABC Snq2. **A.** Modelo 3-D do domínio 2 da proteína Snq2. Em amarelo está representado o domínio citoplasmático e em vermelho o domínio transmembrana da proteína. **B.** Superfície molecular hidrofóbica; níveis mais elevados de marrom indicam regiões mais hidrofóbicas e níveis mais elevados de azul indicam regiões menos hidrofóbicas. Seta indicando região com maior nível de hidrofobicidade 44

Figura 9: Resultado da análise de interação entre proteínas por Docking. **A.** Superfície molecular com proteínas complexadas; TcPR-10mut indicada em rosa (ligante) e domínio 1 da Snq2 indicada em verde (receptor). **B.** Representação dos resíduos de aminoácidos onde ocorreu interação 46

Figura 10: Resultado da análise de interação entre proteínas por Docking. **A.** Superfície molecular com proteínas complexadas; TcPR-10mut indicada em lilás (ligante) e domínio 2 da Snq2 indicada em vermelho (receptor). **B.** Representação dos resíduos de aminoácidos onde ocorreu interação 46

Material suplementar 1: Gráfico de Ramachandran para validação da estrutura dos domínios 1 e 2 da Snq2 47

CAPÍTULO 2

Figura 1: Dendograma gerado pelo Archeopteryx, representando comparativamente proteínas PR-10 de tomate e cacau. 1. Marcado em amarelo está representado o primeiro grupo, caracterizado por possuir maior heterogeneidade

entre as sequências. **2.** Representado na cor preta está o segundo grupo, com PR-10 de tomate em sua maioria, onde foi agrupada a TcPR-10mut. **3.** Representado na cor azul está o terceiro grupo, onde foi predominante a presença de proteínas com alto potencial de alergenicidade61

Figura 2: Esquema do gene *TcPR-10mut* com o peptídeo sinal do gene *TcPR-4*. Em vermelho a sequência do peptídeo sinal e em preto a sequência genica do *TcPR-10mut* 62

Figura 3: **A. Eletroforese em gel de agarose com o produto de PCR utilizando primers PR10 SacI (R) e PR4-PR10 (F).** M: marcador de 1Kb. C-: controle negativo. A1: amplificação do gene *TcPR-10mut*, amplificando um fragmento de 480 pb. **B. Eletroforese em gel de poliácridamida com o produto de PCR utilizando primers PR-PS (R) e PR10PS Apal (F).** M: marcador de 50 bp. C-: controle negativo. A1: amplificação do peptídeo sinal do gene *TcPR-4*, apresentando um fragmento de 60pb. A2: peptídeo sinal purificado63

Figura 4: Eletroforese em gel de agarose com o produto de PCR utilizando primers SacI R e PR10PS Apal F. M: marcador de 1 Kb. C-: controle negativo. A1: amplificação da construção gene *TcPR-10mut* com o peptídeo sinal da *TcPR-4*, amplificando um fragmento de 540 pb. A2: construção purificada..... 64

Figura 5: Eletroforese em gel de agarose. M: marcador de 1 Kb. A1 e A2: PUC118/35S fechado, antes da digestão A3 e A4: PUC118/35S após digestão com enzimas Apal e SacI. A5 e A6: PUC118/35S purificado por precipitação em fenol clorofórmio65

Figura 6: Confirmação das colônias positivas para transformação. Eletroforese em gel de agarose com o produto do PCR de colônia utilizando primers SacI R e PR10PS Apal F. M: marcador de 1 Kb. C-: controle negativo. A1, A2, A3 e A4: produto do PCR das colônias individuais amplificando de um fragmento de 540 pb.65

Figura 7: Eletroforese em gel de agarose da reação de digestão para confirmação da colônia transformada. M: marcador de 1 Kb. A1: reação de digestão do PUC118/35S que liberou um fragmento de aproximadamente 1200 pb, referente ao cassete contendo promotor, gene *PS:TcPR-10mut* e terminador.....66

Figura 8: Representação esquemática do plasmídeo pCAMBIA2301 e da construção para validação da exportação da proteína do citoplasma ao espaço extracelular da célula vegetal. **A.** Construção do cassete contendo contendo peptídeo sinal, gene *TcPR-10mut* e GFP sob o controle do promotor constitutivo e terminador CaMV35S. **B.** Gene *nptII* como gene de seleção de resistência à kanamicina, sob controle do promotor CaMV35S, sinal de poliadenilação CAMV e múltiplo sítio de clonagem contendo sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *PstI*. **C.** Seta indicando a fusão do cassete *PS:TcPR-10mut:GFP* com o pCAMBIA 230167

Figura 9: Modelagem da TcPR-10mut e sua fusão com GFP. **A.** modelagem da proteína TcPR-10mut, estruturalmente contendo seis folhas beta, três alfa hélices e alguns motivos P-loop. **B.** Proteínas TcPR-10mut contendo peptídeo sinal fusionada a GFP; seta indica a TcPR-10mut com sua estrutura sendo influenciada pela fusão com GFP 67

Figura 10: Representação esquemática do plasmídeo pCAMBIA2301 e da construção para exportação da proteína do citoplasma ao espaço extracelular da célula vegetal. **A.** Construção do cassete contendo contendo peptídeo sinal e gene *TcPR-10mut* sob o controle do promotor constitutivo e terminador CaMV35S. **B.** Gene *nptII* como gene de seleção de resistência à kanamicina, sob controle do promotor CaMV35S, sinal de poliadenilação CAMV e múltiplo sítio de clonagem contendo sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *PstI*. **C.** Seta indicando a fusão do cassete *PS:TcPR-10mut* com o pCAMBIA 2301..... 68

Figura 11: Reação de Digestão e PCR para confirmação de síntese do clone contendo a construção *PS:TcPR-10mut*. **A.** **M:** marcador de 1Kb; **A1:** controle negativo (vetor pCAMBIA 2301 digerido, sem a construção *PS:TcPR-10mut*); **A2, A3, A4, A5:** digestão do vetor pCAMBIA 2301 contendo a construção *PS:TcPR-10mut*, liberando um fragmento de aproximadamente 1400pb. **B.** **M:** marcador de 1Kb; **C-:** controle negativo (reação de PCR sem DNA); **C+:** controle positivo (reação de PCR com vetor pCAMBIA 2301 sem a construção *PS:TcPR-10mut*); **A1, A2, A3, A4:** amplificação de um fragmento de aproximadamente 800pb referente ao gene *NptII* do vetor pCAMBIA2301 contendo a construção *PS:TcPR-10mut*..... 68

Figura 12: Células de explantes de tomate que passaram pelo evento de transformação, via *Agrobacterium tumefaciens*, com a construção *PS:TcPR-10mut*, em meio de regeneração 69

Material suplementar 1: Análise da sequência da proteína TcPR-4 pelo programa SignalP 4.1. Na cor vermelha o C-score (pontuação do sítio de clivagem bruta); Na cor verde o S-score (pontuação do peptídeo sinal); Na cor azul o Y-score (pontuação do sítio combinado de clivagem); Na cor lilás o *threshold* com valor do ponto de corte de 0.450 70

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Classificação de proteínas PR por família.....	12
---	----

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Proteínas relacionadas ao estresse, com base na classificação de Silva et al (2013)	35
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Composição dos diferentes meios utilizados nesse estudo	59
--	----

Tabela 2. <i>Primers</i> específicos para reação de <i>overlap extension Polymerase Chain Reaction</i> . Em vermelho <i>primers</i> contendo mutações	63
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC-	ATP binding cassette
AA-	Ácido ascórbico
AO-	Ácido oxálico
AOX-	Alternative oxidase
APX-	Ascorbate peroxidase
ATP-	Adenosine triphosphate
CAP-	<i>Catabolite gene activator protein</i> ou Proteína reguladora por AMPc
CAT-	catalase
CO ₂ -	Dióxido de carbono
COC-	Cristais de oxalato de cálcio
DHAR-	deidroascorbato redutase
DNA-	Ácido desoxirribonucleico
GOXO-	Oxalato oxidase
GPX-	Guaiacol peroxidase
HR-	Hypersensitive response
MDHAR-	Monodehidroascorbato redutase
NEP-	Ethylene-inducing proteins
OGM-	Organismos geneticamente modificados
CaOx-	Oxalato de cálcio
OXDC-	Oxalato descarboxilase
PCD-	Programmed cell death
H ₂ O ₂ -	Peróxido de hidrogênio
PR-	Relacionado a patogênese
HSP-	Heat Shock protein
OH-	Radical hidroxil
O ₂ -	Radical superóxido
PRR-	Receptores de reconhecimento padrão
ROS-	Espécies reativas de oxigênio
SAR-	resposta sistêmica adquirida

$^1\text{O}_2$ - *Singlet oxygen*

SOD- Superóxido desmutase

TMV- vírus do mosaico do tabaco

1. INTRODUÇÃO

Até a década de 80, a economia do Sul da Bahia se baseava no cultivo do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.). A partir de 1989, a doença vassoura-de-bruxa causada pelo fungo basidiomicota *Moniliophthora perniciosa*, foi responsável pela devastação de grande parte do cultivo do cacau, gerando graves impactos econômicos e sociais, nessa região (PEREIRA et al., 1989). A chegada dessa doença refletiu muito na produção de amêndoas, fonte de matéria prima para o chocolate (ALMEIDA; VALLE, 2008). Reduzindo sua produção, no Brasil, em aproximadamente 300.000 toneladas, e na Bahia chegou a acarretar uma redução de 70% da produção em um período de 10 anos (BOWERS et al., 2001; *International Cocoa Organization*, ICCO, 2017).

Por se tratar de um fungo hemibiotrófico, *M. perniciosa* apresenta duas fases bem distintas em seu desenvolvimento. O primeiro estágio é o biotrófico, em que o fungo apresenta hifas monocarióticas e coloniza o apoplasto (espaço intercelular) do cacaueiro. Essa colonização ocorre de forma rápida e o fungo obtém os nutrientes necessários para sua sobrevivência e desenvolvimento. Nessa fase são formadas as vassouras verdes. No segundo estágio, os tecidos da planta desenvolvem necrose e o fungo passar a colonizar o espaço intracelular da planta, caracterizando assim o estágio de vassoura seca. Nessa fase as hifas do fungo apresentam grampos de conexão e micélio dicariótico. O final dessa fase é marcado pelo desenvolvimento do basidioma, corpo de frutificação onde estão contidos os basidiósporos, único propágulo infectivo do fungo (MONTEIRO; AHNERT, 2012; SCARPARI et al., 2005; SILVA et al., 2002).

Por outro lado o cacaueiro, assim como outras plantas, quando submetidos a estresses causados pela invasão por patógenos, estabelecem barreiras para tentar limitar e impedir possíveis danos. Mudanças metabólicas e a níveis transcricionais ocorrem no tecido vegetal (DA HORA JUNIOR et al., 2012; GESTEIRA et al, 2007; TEIXEIRA et al., 2014). Muitas vezes essas barreiras não são suficientes e a doença progride com a invasão da planta pelo patógeno. O melhoramento genético de plantas, por meio de técnicas da engenharia genética, surge como uma alternativa para o desenvolvimento de organismos geneticamente modificados (OGM) com

características de resistência a esses patógenos. Além disso, ferramentas da bioinformática tem sido amplamente exploradas para a predição, caracterização e comparação a nível molecular, auxiliando o entendimento de diversos eventos biológicos (LAGUNIN et al., 2014; MOXON et al., 2008; PIERCE et al., 2014).

As proteínas PR estão relacionadas com a defesa da planta contra patógenos. São naturalmente produzidas pela planta, sendo induzidas em situações de estresse (FERNANDES et al., 2009). Estudos realizados com *T. cacao* em contato com fungos patogênicos revelaram aumento da expressão de membros de diversas famílias de proteínas PR (FISTER et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2014). Assim, genes PR apresentam grande potencial para serem utilizados em transformação genética de plantas de cacau, com a finalidade de resistência a doença vassoura-de-bruxa (MENEZES et al., 2012; MENEZES et al., 2014; PUNGARTNIK et al., 2009). A família das PR-10 é caracterizada por possuir proteínas com cavidade hidrofóbica capaz de se ligar a diversas moléculas. São pequenas proteínas ácidas e intracelulares (CASAÑAL et al., 2013; CHADHA; DAS, 2006; SANTIAGO et al., 2009;). Possui um domínio conservado em proteínas de grão de pólen, que está relacionado ao seu potencial de alergenicidade (FERNANDES et al. 2013; PUNGARTNIK et al., 2009). A sua ampla distribuição no reino vegetal sugere uma importante função para as plantas. Contudo, os papéis das proteínas PR-10 ainda não estão totalmente compreendidos.

Em *Theobroma cacao* a PR-10 (*TcPR-10*) tem sido alvo de estudos sobre o controle de doenças e mecanismos de resistência da planta a *M. pernicioso* (GESTEIRA et al., 2007). A análise da sua sequência mostrou ausência de peptídeo sinal, sugerindo localização citoplasmática para essa proteína. Além disso, tem sido relatado que a *TcPR-10* tem atividade de ribonuclease e antifúngica contra *M. pernicioso* (PUNGARTNIK et al., 2009). O gene *TcPR-10* apresenta, desse modo, potencial biotecnológico para o uso em estudos voltados ao combate da vassoura-de-bruxa (MENEZES et al., 2012; PUNGARTNIK et al., 2009). No entanto, apesar do seu potencial biotecnológico, a *TcPR-10* possui o motivo P loop semelhante a proteínas alergênicas, como BetV1 (*Betula verrucosa*) (GAJHEDE et al., 1996) e Pru av 1 (*Prunus avium*) (WICHE et al., 2005; SCHENK et al., 2006). Com a finalidade de reduzir o potencial alergênico dessa proteína, foram realizadas mutações nesse motivo, diminuindo sua alergenicidade sem alterar a sua função enzimática de

ribonuclease e antifúngica (MENEZES et al., 2012). A TcPR-10 mutante (TcPR-10mut) se torna portanto, uma biomolécula alvo com potencialidade de ser usada em transformação genética de plantas, como tomate, que é um importante modelo para estudo da interação cacau-*M. perniciosa* (MARELLI et al., 2009).

Entender a funcionalidade e como a proteína mutante (TcPR-10mut) atua, é uma importante ferramenta para compreensão de eventos biológicos complexos que são ativados no patossistema cacau-*M. perniciosa*. Desse modo, o presente trabalho tem como objetivo geral: i) estudar a interação da proteína TcPR-10 mutante com *Moniliophthora perniciosa* e *Saccharomyces cerevisiae*, avaliando sua ação *in silico*; e ii) obter plantas de *Solanum Lycopersicum* var. 'Micro-Tom' transformadas com *TcPR-10mut* endereçada ao apoplasto.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1. A vassoura-de-bruxa do cacau

2.1.1 Um breve histórico

O cacau (*Theobroma cacao*) é uma espécie vegetal perene, preferencialmente alógama, diploide $2n = 20$, predominante em florestas quentes e úmidas, característica de regiões tropicais (CUATRECASAS, 1964; DAVIE, 1933). Inicialmente foi descrito como pertencente à família Sterculiaceae (CUATRECASAS, 1964) sendo mais tarde incluído na família Malvaceae (ALVERSON et al. 1999). Seu gênero é composto por 22 espécies que apresentam grande variabilidade genética e diversidade morfológica (BARTLEY, 2005; MONTEIRO; AHNERT, 2012). Com base em distinções morfogeográficas grande parte da espécie foi dividida em três grupos: Forasteiro, Criollo e Trinitário (CHEESMAN, 1944, apud MONTEIRO; AHNERT, 2012, p. 15; MOTAMAYOR et al. 2003). O Cultivar Forasteiro tem como centro de origem a América do Sul, mais precisamente as bacias amazônicas. É considerado o grupo com maior diversidade genética e maior qualidade agrônômica em relação ao Criollo, pois possui resistência às principais pragas e doenças (MONTEIRO; AHNERT, 2012; MOTAMAYOR et al. 2002; 2003). Sugere-se que alguns indivíduos Forasteiros foram introduzidos pelo homem na América central dando origem ao cacau Criollo, cultivado pelos Maias por mais de 1500 anos. O Trinitário tem origem da hibridização natural entre os cultivares Criollo e Forasteiro Amelonado, sendo mais produtivo e resistente a doenças (HALL, 1914; MICHELI et al., 2010; MOTAMAYOR et al. 2002; 2003).

Dentre as 22 espécies que compõem o gênero *Theobroma*, apenas o cacau e o cupuaçu são aproveitados comercialmente no Brasil, sendo o cacau a espécie mais explorada economicamente (MONTEIRO; AHNERT, 2012). Seu valor econômico está, principalmente, na sua amêndoa que é a fonte de matéria prima principal para a produção de chocolate, mas também para outros subprodutos como geleias, cosméticos, remédios, bebidas e outros derivados (ALMEIDA; VALLE, 2008; SILVA NETO, 2001). Seu cultivo no Brasil está disperso em cinco estados: Pará, Mato Grosso, Rondônia, Amazonas e Bahia (SILVA NETO, 2001). Na Bahia, o

cacau foi introduzido por meio de sementes da população do grupo Forasteiro Baixo Amazônico por volta de 1746, sendo o Catongo uma variedade mutante albina desse grupo, amplamente cultivada no estado (MICHELI et al., 2010; MONTEIRO; AHNERT, 2012).

Em 1904, houve o primeiro relato da vassoura-de-bruxa com ocorrência no Suriname (WENT, 1904). O agente causal dessa doença foi originalmente descrito como *Marasmius perniciosus* Stahel (STAHEL, 1915), sendo mais tarde transferido para o gênero *Crinipellis* (SINGER, 1942) e posteriormente classificado como *Moniliophthora perniciosa*, pertencente à família Marasmiaceae (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005). Trata-se de uma das mais importantes doenças em países produtores de cacau da América tropical (SENA; ALEMANNIO; GRAMACHO, 2014). Assim como o seu hospedeiro, *M. perniciosus* é nativo da floresta amazônica. Seus esporos são produzidos em grandes quantidades, mas sua dispersão em distâncias maiores que 60 km não é possível. Desse modo, sugere-se que a doença tenha sido introduzida por intervenção humana (GRIFFITH, 2004).

Na década de 80, o cultivo do cacaueiro constituía a base econômica da região Sul da Bahia. Todavia, em 1989, a introdução nesta região da doença endêmica da Amazônia brasileira, chamada vassoura-de-bruxa (PEREIRA et al., 1989), gerou um impacto econômico muito grande (MENEZES; CARMO, 1993). No Brasil, a produção de amêndoas caiu de 400.000 para 100.000 toneladas (BOWERS et al., 2001) e no estado da Bahia promoveu diminuição de 70% da produção, em um período de 10 anos (*International Cocoa Organization*, ICCO, 2017). O primeiro local onde foi identificado o patógeno foi o município de Uruçuca no final da década de 80. O clima quente e úmido do sul da Bahia, favoreceu o estabelecimento, desenvolvimento e disseminação do fungo (CUENCA; NAZÁRIO, 2004).

2.1.2 Descrição da biologia da interação *Theobroma cacao* - *Moniliophthora perniciosa*

Moniliophthora perniciosa é um fungo patogênico do filo basidiomicota com ciclo de vida hemibiotrófico (EVANS, 1980). Assim, *M. perniciosus* apresenta duas

fases genética e morfologicamente diferentes no seu ciclo de vida: fase parasítica (biotrófica) e fase saprofítica (necrotrófica).

Na fase biotrófica os basidiósporos, único propágulo infeccioso de *M. perniciosa*, entram em contato com a superfície do tecido vegetal onde germinam formando um tubo germinativo que penetra na planta. O tubo germinativo exerce força mecânica e desintegração enzimática da superfície do tecido, permitindo a sua passagem e posterior desenvolvimento das hifas primárias. Os locais de penetração podem ser tricomas, estômatos, aberturas naturais na superfície cuticular ou na cutícula intacta entre as junções da parede celular epidérmicas (MEINHARDT et al., 2008; PURDY; SCHMIDT, 1996; SENA; ALEMANNO; GRAMACHO, 2014). As hifas, com formato de *club-shaped tips*, migram para regiões abaixo das células epidérmicas em direção aos feixes vasculares (SCARPARI et al., 2005). Nessa fase o fungo infecta os tecidos meristemáticos do cacauete e passa a colonizar o espaço do apoplasto da planta desenvolvendo um micélio monocariótico, com o qual obtém os nutrientes para se desenvolver (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005; PURDY; SCHMIDT, 1996).

A colonização do fungo gera mudanças morfológicas e bioquímicas no tecido do hospedeiro que culminam nos sintomas característicos da vassoura-de-bruxa (GRIFFITH, 2003; SCARPARI et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2014). Os sintomas podem variar dependendo do órgão infectado e do estágio de desenvolvimento da planta. Na etapa biotrófica do ciclo do fungo, é possível ver na planta a nível macroscópico a formação de vassouras verdes, evidenciadas por inchaço do caule (hipertrofia e hiperplasia), perda de dominância apical e folhas deformadas de cor verde claro (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005; PURDY; SCHMIDT, 1996). Scarpari et al. (2005) propôs um esquema de desenvolvimento da doença. Entre os dias 1-14 ocorre a germinação dos basidiósporos, infecção inicial e estabelecimento da doença (Figura 1); a fase de 21-35 dias é marcada por mudanças metabólicas e formação da vassoura verde (Figura 1).

Na fase de vassoura verde, a nível molecular, ocorre uma diminuição das concentrações de carboidratos no fluido apoplástico. Desse modo, *M. perniciosa* parece estar sujeito a um ambiente pobre em carbono imediatamente antes da morte do tecido. (BARAU et al., 2014). O transcriptoma de cacau e *M. perniciosa*

foram avaliados simultaneamente, usando RNA-seq, durante a interação biotrófica da doença. Com essa abordagem foram identificados genes regulados positivamente no estágio de vassoura verde. Em *M. pernicioso* foram encontradas proteínas que abrigam o domínio CAP de proteínas relacionadas a patogênese (PR-1), supondo que elas possuem papel de desintoxicação de toxinas lipídicas produzidas pelo cacau durante a infecção (TEXEIRA et al., 2014). A *MpPR-1* foi expressa, mostrando que possui propriedades de ligação lipídica e promove a secreção de esteróis e ácidos graxos (DARWICHE et al., 2017).

Diferente de outras interações hemibiotróficas a fase biotrófica, na interação *M. pernicioso* e *T. cacao*, é mais longa do que a necrotrófica, apresentando os sintomas mais distintivos da doença (DA HORA JUNIOR et al., 2012; MEINHARDT et al., 2008; SCARPARI et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2014). A expressão de um gene AOX, identificado no genoma de *M. pernicioso*, foi analisada durante o ciclo de vida do fungo. O fungo usa vias de transferência de elétrons para a respiração celular. O estágio biotrófico utiliza a via respiratória da oxidase alternativa mitocondrial (*mitochondrial alternative oxidase, 13 AOX*), ocorrendo redução considerável na produção de energia celular. Desse modo, o aumento da expressão do gene *MpAOX* pode explicar o crescimento lento do fungo na fase biotrófica (THOMAZELLA et al., 2012).

Após a interação biotrófica duradoura, se instala um processo de senescência nos tecidos infectados e o fungo expressa o indutor de necrose NEP2. Assim, a planta passa para a fase necrotrófica (TEXEIRA et al., 2014). Quando *M. pernicioso* começa a desenvolver grampos de conexão entre as células das hifas formando um micélio dicariótico, se caracteriza a fase necrotrófica, acarretando na progressão da doença. Esse micélio se nutre do conteúdo intracelular da planta gerando necrose do tecido vegetal. A condição de seca, causada pela desidratação do tecido necrosado, favorece o fungo na produção de suas estruturas reprodutoras, basidioma e seus basidiósporos, fechando o ciclo de vida do fungo (Figura 1) (MONTEIRO; AHNERT, 2012; PURDY E SCHMIDT, 1996; SCARPARI et al., 2005; SILVA et al., 2002).

A morte celular programada (PCD, *Programmed cell death*) e exploração saprofítica pelo patógeno se caracteriza como um sintoma da fase necrotrófica (DE

OLIVEIRA CEITA et al., 2007). Sugere-se uma reprogramação genética no tecido infectado e que essa cascata bioquímica está associada a morte do tecido. A morte tecidual ocorre entre os dias 35-61 (Figura 1), e a fase necrotrófica fica bem evidenciada a partir de 90 dias após a infecção (SCARPARI et al., 2005).

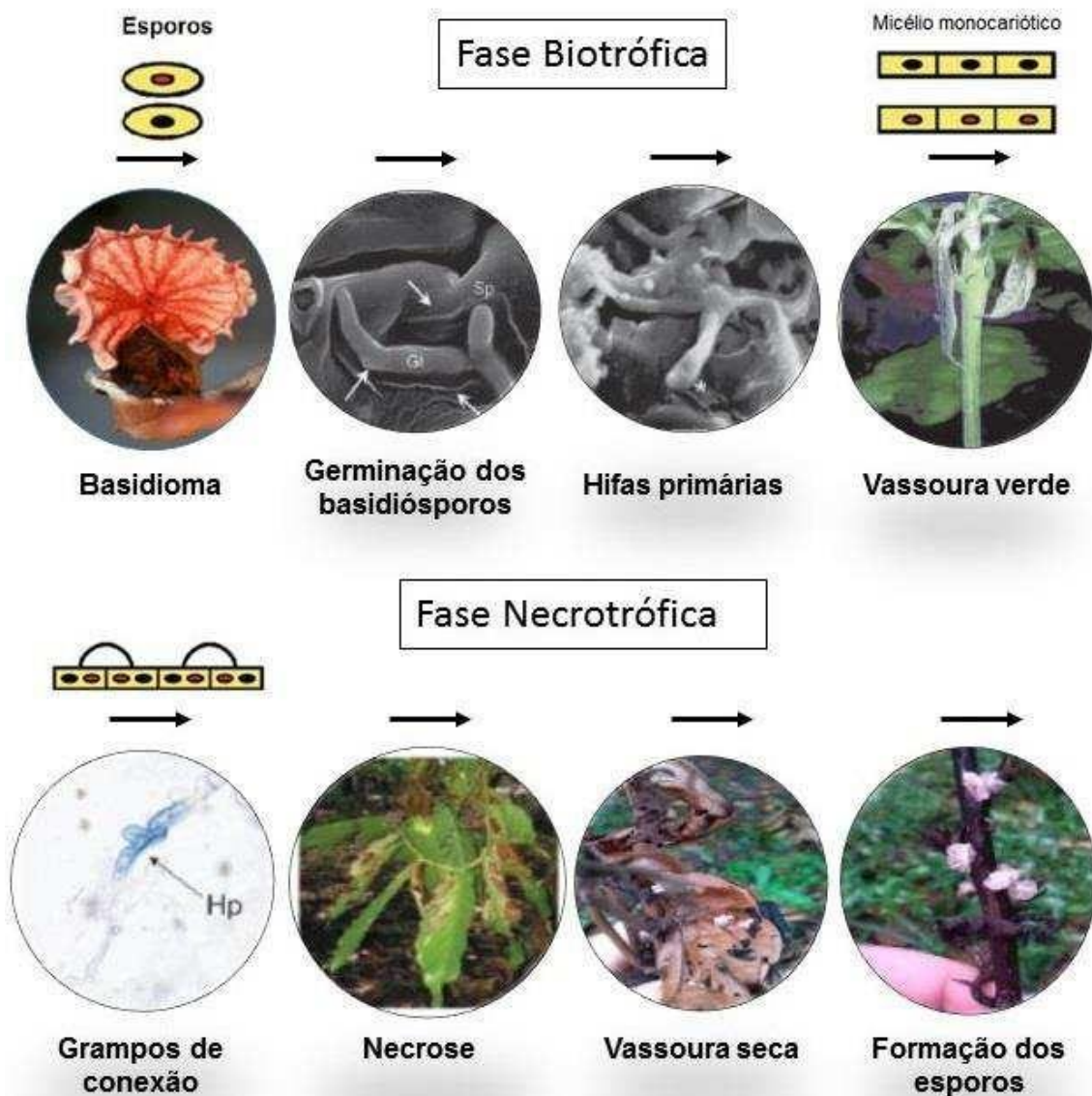


Figura 1: Progressão da doença vassoura-de-bruxa (da esquerda para a direita), desde a fase biotrófica (em cima) até a necrotrófica (em baixo). Estruturas miceliais típicas e número de núcleos por esporo em cada estágio sintomático mostrado. O basidioma libera os basidiósporos que Infectam o tecido vegetal por penetração através da abertura estomática. As hifas se desenvolvem ocorrendo o aparecimento da vassoura verde. A fase necrotrófica se caracteriza pelo desenvolvimento dos grampos de conexão causando a necrose de tecidos

infectados levando a formação da vassoura seca, basidiocarpos e por fim, esporos. Adaptado (Meinhardt et al., 2008; Sena et al., 2014).

Em variedades suscetíveis de cacau a PCD é constatada pela detecção da fragmentação de moléculas de DNA, característica desse processo, além da presença de proteínas do fungo que induzem necrose (DE OLIVEIRA CEITA et al., 2007; GARCIA et al., 2007). Durante a progressão da doença pode ser observada a presença de núcleos apoptóticos no hospedeiro, indicando que irá ocorrer a morte celular dos tecidos infectados. Verifica-se a presença e aumento de COC (cristais de oxalato de cálcio), durante a progressão da doença, atingindo seus níveis mais altos em 33 dias após a infecção. O seu acúmulo pode estar relacionado a presença do ácido ascórbico em tecidos infectados. A degradação de COC, nas plantas suscetíveis, acontece pela ativação da expressão gênica do oxalato oxidase (GOXO) e subsequente produção e acumulação de espécies reativas de oxigênio (ROS), do tipo peróxido de hidrogênio e diminuição na expressão do gene APX de desintoxicação. Esse mecanismo desencadeia PCD, aumentando a disponibilidade de nutrientes ao micélio fúngico, convertendo a fase biotrófica em necrotrófica. Esse cenário é diferente em variedades resistentes, onde não foi detectado COC e o padrão de expressão dos genes GOXO e APX foi oposto aos genótipos suscetíveis (DE OLIVEIRA CEITA et al., 2007). O oxalato possui função fundamental como fonte de ROS. Em plantas de tabaco transgênico superexpressando um gene (OXDC-oxalato descarboxilase) que converte o oxalato em CO₂ e formiato, de *Flammulina velutipes*, a morte celular foi inibida, gerando plantas resistentes a ação de elicitores de necrose presentes em fungos (AO-ácido oxálico e *Nep1-like proteins*). Assim, foi sugerido que a indução de PCD envolve a geração de ROS, fornecida apenas quando ocorre a conversão de oxalato em H₂O₂ (DA SILVA et al., 2011).

As ROS (*reactive oxygen species*) participam de diversos processos fisiológicos e de desenvolvimento da planta, além de possuir um importante papel em mecanismos de resistência a estresses bióticos e abióticos (QUAN et al., 2008). São representadas pelo radical superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxil (OH) e o *singlet oxygen* (¹O₂) (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011). Sua produção dentro da célula se encontra nos cloroplastos (XIANG et al., 2015) e mitocôndrias (WIESE ET AL., 2017), por conta da alta atividade de oxidação ou fluxo

de elétrons nesses compartimentos celulares; e nos peroxissomas, retículo endoplasmático e membrana plasmática (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011). Todavia, concentrações altas de ROS podem resultar em danos oxidativos ou morte apoptótica da célula vegetal (QUAN et al., 2008). Assim, as plantas protegem suas células do efeito citotóxico de ROS com o auxílio de antioxidantes enzimáticos: ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPX), superóxido desmutase (SOD), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), deidroascorbato redutase (DHAR); e não enzimáticos: carotenoides, ácido ascórbico (AA), flavonoides, tocoferóis e glutathione (CAMILLO et al., 2013; DOS SANTOS SOARES; MACHADO, 2007; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011).

Em *T. cacao* a quantidade de cristais de oxalato de cálcio (CaOx) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) apresentam padrões distintos em variedades resistentes e suscetíveis, na interação cacau-*M. pernicioso*. A variedade suscetível acumula mais cristais de CaOx do que a resistente. Isso, porque a dissolução desses cristais ocorre nos primeiros passos da infecção em variedade resistente e no estágio final da doença na variedade suscetível. Quando produzido nos estágios iniciais da infecção pela variedade resistente, ROS contribui para o controle e resistência da planta. Já em estágios avançados da doença, na variedade suscetível, promove o desenvolvimento do patógeno e finalização do seu ciclo de vida (DIAS et al., 2011). Baixas concentrações de H₂O₂, no patossistema *T. cacao-M. pernicioso*, induzem a formação de grampos de conexão nas hifas, possibilitando o encontro dos núcleos e consequente processo de dicarionização (PUNGARTNIK et al., 2009). Em *M. pernicioso* também foram relatados genes relacionados com o processo de desintoxicação de ROS, como os que codificam para: superóxido dismutase, catalases, peroxiredoxinas, sistema de glutathione, enzimas do sistema de tiorredoxina e peroxidases dependentes de manganês (MONDEGO et al., 2008).

Análises da expressão de genes na interação *T. cacao-M. pernicioso*, comparando variedade suscetível (Catongo) e resistente (TSH1188), identificaram genes diferencialmente expressos. Na variedade resistente ocorreu alta produção de ROS e elicitores nos primeiros 30 dias após infecção. Do dia 30 ao 60 houve propagação do sinal de resistência e desintoxicação de ROS. Catongo apresenta um perfil distinto, ocorrendo a produção de proteossomas relacionadas a autofagia, 60 dias após infecção, seguida de PCD. Além disso, ativa a expressão de genes

relacionados a patogênese (PR) 10. Esse aumento sugere uma resposta de defesa local estimulada pela invasão do fungo. Esses genes são expressos principalmente após 60 dias do início da infecção com *M. pernicioso*. Foi constatado que aumentam a sua expressão em até 40 vezes se comparado ao controle, não infectado. A PR-10 de *Theobroma cacao* é sugerido como um bom candidato para abordagens biotecnológicas e estratégias antifúngicas (DA HORA JÚNIOR et al., 2012).

2.2 Proteínas PR- relacionadas a defesa da planta contra patógenos

As plantas, quando submetidas a estresses por invasão de patógenos, estabelecem barreiras para tentar combater possíveis danos. Os mecanismos envolvidos nesse processo podem ser pré-existentes ou induzidos pela planta após o ataque. As barreiras morfológicas e metabólitos secundários pré-existentes devem ser superados para que os agentes patogênicos possam invadir o tecido da planta. Quando o contato consegue se estabelecer, os elicitores do patógeno induzem a defesas do hospedeiro, que incluem reforço da parede celular, produção de fitoalexinas e recrutamento das proteínas relacionadas a patogênese (PR) (CHONG et al., 2008; SLUSARENKO; FRASER; VAN LOON, 2000).

Entender a funcionalidade do grande número de genes, que atuam conjuntamente na resposta do hospedeiro, é um importante passo para compreensão de eventos biológicos complexos que são ativados quando ocorre a interação planta-patógeno. As proteínas relacionadas a patogênese (PR), por exemplo, foram descritas em muitas espécies de plantas após a infecção por fungos, bactérias, vírus e ataques de nematódeos e insetos (VAN LOON, 1999; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). Estudos têm tentado elucidar parte dos mecanismos envolvidos na resposta de defesa de *T. cacao* ao ataque do fungo *M. pernicioso*. Algumas informações revelaram genes cuja expressão diferencial é potencialmente relacionada a interação planta-patógeno, proteínas PR, principalmente na fase final da doença (DA HORA JÚNIOR et al., 2012; GESTEIRA et al., 2007). As proteínas PR podem ocorrer na planta na ausência de infecção patogênica e terem a sua expressão aumentada quando ocorre interação com o patógeno. Dentre essas proteínas encontram-se a glucanase PR-2, quitinase PR-3 e PR-10 presentes no

pólen de várias espécies (VAN LOON et al., 1994; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

As proteínas PR, podem ser induzidas não apenas em resposta ao ataque de patógenos mas também em situações de estresse abiótico. Essas proteínas possuem atividade antifúngica, antibacteriana (FERNANDES, 2009) e algumas possuem uma cavidade interna capaz de se associar a ligantes hidrofóbicos, como o ácido abscísico (RADAUER et al., 2008; SANTIAGO et al., 2009). Foram identificadas pela primeira vez em um estudo que verificou alterações na constituição proteica em plantas de tabaco, após infecção com o vírus do mosaico do tabaco (TMV) (VAN KAMMEN, 1970; VAN LOON). Suas características incluem baixo peso molecular, tamanho de 5 a 75 kDa, solubilidade em pH ácido, alta resistência a proteases e a maioria se encontram no espaço extracelular, mas algumas podem ser encontradas no citoplasma e vacúolo (LIU et al., 2006; PUNGARTNIK et al., 2009; SELS et al., 2008; VAN LOON, 1985;).

Até o período de 1999 foram classificadas 14 famílias para as proteínas PR (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999), sendo mais tarde agrupadas em 17 famílias, altamente divergentes (Tabela 1). Essas proteínas desempenham uma série de funções dentro da célula, dentre elas podemos destacar a atividade de quitinase, ribonuclease e ação antifúngica. Essas funções biológicas, conferem às proteínas PR alto potencial de defesa de plantas contra patógenos (CHRISTENSEN et al., 2002; FERREIRA et al., 2007).

Tabela 1. Classificação de proteínas PR por família.

Família	Membro típico	Massa molecular (kDa)	Propriedade
PR-1	Tabaco PR-1 ^a	15	Antifúngica
PR-2	Tabaco PR-2	30	β -1,3-glucanase
PR-3	Tabaco P, Q	25-30	Quitinase classes I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Tabaco 'R'	15-20	Quitinase classe I e II
PR-5	Tabaco S	25	Taumatina
PR-6	Tomate Inibidor I	8	Inibidor de proteinase
PR-7	Tomate P69	75	Endoproteinase
PR-8	Quitinase de pepino	28	Quitinase classe III
PR-9	Tabaco ' <i>lignin forming peroxidase</i> '	35	Peroxidase

PR-10	Parley PR1	17	Ribonuclease
PR-11	Tabaco quitinase 'classe V'	40	Quitinase classe I
PR-12	Rabanete Rs- AFP3	5	Defensina
PR-13	Arabidopsis THI2-1	5	Tionina
PR-14	Cevada LTP4	α	Proteína de transferência de lipídeos
PR-15	Cevada OxOa (germin)	20	Oxalato oxidase
PR-16	Barley OxOLP	20	Oxalato oxidase-like
PR-17	Tabaco PRp27	27	Desconhecida

De acordo com Sels et al., 2008.

Na interação *T. cacao-M. pernicioso*, foi constatado que em vassouras verdes ocorre a expressão de pelo menos 67 genes pertencentes ao grupo das proteínas PR, dentre eles membros das famílias PR-1, PR2, PR-3, PR-4, PR-8, PR-11, PR-5, PR-6, PR-9 e PR-10 (TEIXEIRA et al., 2014). Recentemente todos os membros das 17 famílias de genes PR presentes do genoma de *Theobroma cacao* foram identificados, resultando em um total de 350 membros nos dois genomas de cacau publicados (ARGOUT et al., 2011; MONTAMAYOR et al., 2013). O perfil de expressão dos genes PR foi analisado. Foram identificados vários membros das famílias PR-1, PR-3, PR-4 e PR-10, que tiveram maior resposta ao ataque dos patógenos *Phytophthora palmivora* e *Colletotrichum theobromicola* (FISTER et al., 2016).

As proteínas PR se acumulam no local da infecção e estão associadas a HR (resposta hipersensível) e a SAR (resposta sistêmica adquirida), contra a infecção por fungos, bactérias e vírus (JAIN; KUMAR, 2015; VAN LOON et al., 1994). Em tabaco os níveis de PR bem como de uma proteína chamada SAR 8.2 foram aumentados em resposta a infecção por TMV (WARD et al., 1991). Quando ocorre a interação da planta com agentes patogênicos, genes relacionados a defesa são ativados e de forma coordenada eles são expressos nos tecidos infectados e não infectados, com o estabelecimento de SAR (RYALS et al., 1996).

Os genes PR são regulados por fatores de transcrição (Pti4, 5 e 6) que reconhecem sequências de resposta ao etileno. Em *Arabidopsis* esses fatores ativaram genes regulados pelo ácido salicílico (PR-1 e PR-2), ácido jasmônico e

etileno (PR-3 e PR-4). A aplicação do ácido salicílico na parte externa das plantas estimulou ainda mais a expressão da PR-1. Os resultados sugerem que esses fatores de transcrição ativam a expressão de uma ampla gama de genes PR, desempenhando papéis importantes e distintos na defesa da planta (GU et al., 2002).

2.3 Proteínas relacionadas à patogênese – PR-10

As proteínas PR-10 foram inicialmente identificadas em ervilha e salsa (FRISTENSKY et al., 1988; SOMSSICH et al., 1986). Elas são caracterizadas por possuírem uma cavidade hidrofóbica capaz de se ligar a ácidos graxos, esteroides (MARKOVIC-HOUSLEY et al., 2003), flavonoides (CASAÑAL et al., 2013), ácido abscísico (SANTIAGO et al., 2009) e citocininas (FERNANDES et al., 2008; FUJIMOTO et al., 1998). As PR-10, compreendem proteínas ácidas, pequenas e intracelulares (CHADHA; DAS, 2006; LIU; EKRAMODDOULLAH, 2006; YANG et al., 1997). Possuem no N-terminal um motivo rico em glicina (GxGGxG) semelhante ao motivo Bet v1 que acredita-se estar relacionado a atividade de ribonuclease. A PR-10 não possui afinidade pelo ATP e por isso o loop rico em glicina em conformacionalmente diferente do P loop que se liga a fosfato (FERNANDES et al. 2013; SARASTE; SIBBALD, 1990; WEN et al., 1997). PR-10 possuem homologia com proteínas presentes em grãos de pólen, *Betv 1* (BREITENEDER et al., 1989). Atualmente a única propriedade enzimática atribuída a algumas das proteínas PR-10 é a de atividade de ribonuclease (BANTIGNIES et al., 2000; KOISTINEN et al., 2002; PUNGARTNIK et al., 2009). Essa atividade pode inibir o crescimento das células do patógeno por meio do impacto citotóxico em suas células. Provavelmente essas proteínas participam também da apoptose de células vegetais contribuindo com o desenvolvimento de HR (FILIPENKO et al., 2013).

Grande número de genes PR-10 foram clonados e caracterizados em diferentes espécies em resposta estresses abióticos e bióticos. Já foram estudados vários papéis para as proteínas PR-10, relacionados com o envolvimento em processos enzimáticos (BUFE et al., 1996), biossíntese de metabolitos secundários, processos antimicrobianos, armazenamento, ligação à membrana, transporte de

fitohormônio e ligantes hidrofóbicos, todas conduzidas *in vitro* (JAIN; KUMAN, 2015). Contudo, os papéis das proteínas PR-10 ainda não estão totalmente compreendidos.

Recentemente foi verificado que as proteínas PR-10 com regiões de aminoácidos conservados possuem atividade aldo/ceto redutase com substratos incluindo aldeídos tóxicos fisiologicamente como o malondialdeído e o metilglioxal. Esses aldeídos são espécies reativas de carbonila que ao serem sintetizados causam danos as células (JAIN et al., 2016). A ligação induzida dessa proteína a trans-zeatina, hormônio do grupo das citocininas, também foi analisado por cristalografia demonstrando mudanças na conformação da proteína (ŚLIWIAK et al., 2016). Um estudo com a *Betv 1*, proteína integrante do grupo das PR-10 também foi descrita com a função de transporte de esteroides. Esse papel de transporte pelas PR-10 pode ser de importância fundamental na resposta de defesa da planta frente a situação patológicas, bem como crescimento e desenvolvimento (MARKOVIĆ-HOUSLEY et al., 2003).

A *TcPR-10* de *Theobroma cacao* foi identificada em uma biblioteca de cDNA de interação compatível cacau-*M. pernicioso*, (GESTEIRA et al., 2007). Estudos posteriores, foram realizados para identificar possíveis funções dessa proteína. As sequências de nucleotídeos e aminoácidos mostraram homologia com outras proteínas PR-10, contendo um motivo P loop e domínio *Betv1*. A *TcPR-10* pertence a um grupo conhecido por ter homologia com ribonucleases. O motivo P loop e os aminoácidos conservados (E97, E149 e Y151) sugerem atividade de RNase. De fato foi demonstrado atividade de RNase, mas não de DNase no RNA de *M. pernicioso*, além de toxicidade antifúngica e inibição da germinação de basidiósporos. O micélio monocariótico, bem como os basidiósporos, mostrou maior resistência a *TcPR-10* do que o dicarótico. Essa atividade pode ajudar a proteger a planta durante a PCD ou pode agir diretamente no patógeno. Também foi visto que a *TcPR-10* é ativamente transportada para células de levedura e que a sua atividade antifúngica é diminuída em mutantes com transporte de cobre de alta afinidade prejudicada e na ausência de permeases de exportação (*Snq2*). Processo semelhante pode ocorrer em *M. pernicioso*. A análise de sequência mostrou que *TcPR-10* não possui peptídeo sinal, sugerindo que é uma proteína intracelular localizada no citosol (PUNGARTNIK et al., 2009).

Proteínas diferencialmente expressas foram identificadas em *M. pernicioso* durante a interação com TcPR-10, por meio de uma análise proteômica foram reveladas 191 proteínas, das quais 55 foram identificadas por espectrometria de massa. Foram encontradas proteínas relacionadas ao metabolismo celular, resposta ao estresse, ligação ao zinco, mecanismo de fosforilação, transporte, autofagia, reparo de DNA e oxidoreductase. Mostrando que a sensibilidade do fungo a essa proteína envolve várias rotas bioquímicas. Dentre todas, a classe predominante foi a de resposta ao estresse, incluindo proteínas *heat shock*, conhecidas por desencadear mecanismos de defesa contra drogas citotóxicas, semelhante a TcPR-10. A atividade de ribonuclease dessa proteína induz no fungo uma reação de desintoxicação e geração de energia (ATP). Nesse estudo, sugere-se que a TcPR-10 pode superar a resistência do fungo, atuando como um agente antifúngico (SILVA et al., 2013).

Apesar do seu potencial biotecnológico, a TcPR-10 (Figura 2B, C e E) apresenta alergenicidade. Seu motivo P loop (Figura 2A) é semelhante a de algumas proteínas alergênicas (Bet v 1 e Pru av1). Menezes et al (2012) realizaram mutações neste motivo (Figura 2D e F), a fim de produzir proteínas com potencial alergênico reduzido. A alergenicidade foi avaliada nas proteínas do tipo selvagem e mutante, utilizando ferramentas da bioinformática e ensaios imunológicos (MENEZES et al., 2012). Estes dados permitiram admitir que a proteína TcPR-10 mutante perde a alergenicidade sem interferência na sua função enzimática de ribonuclease e atividade antifúngica, sendo portanto, uma biomolécula alvo com potencialidade de ser usadas em transformação genética de plantas (MENEZES et al., 2012).

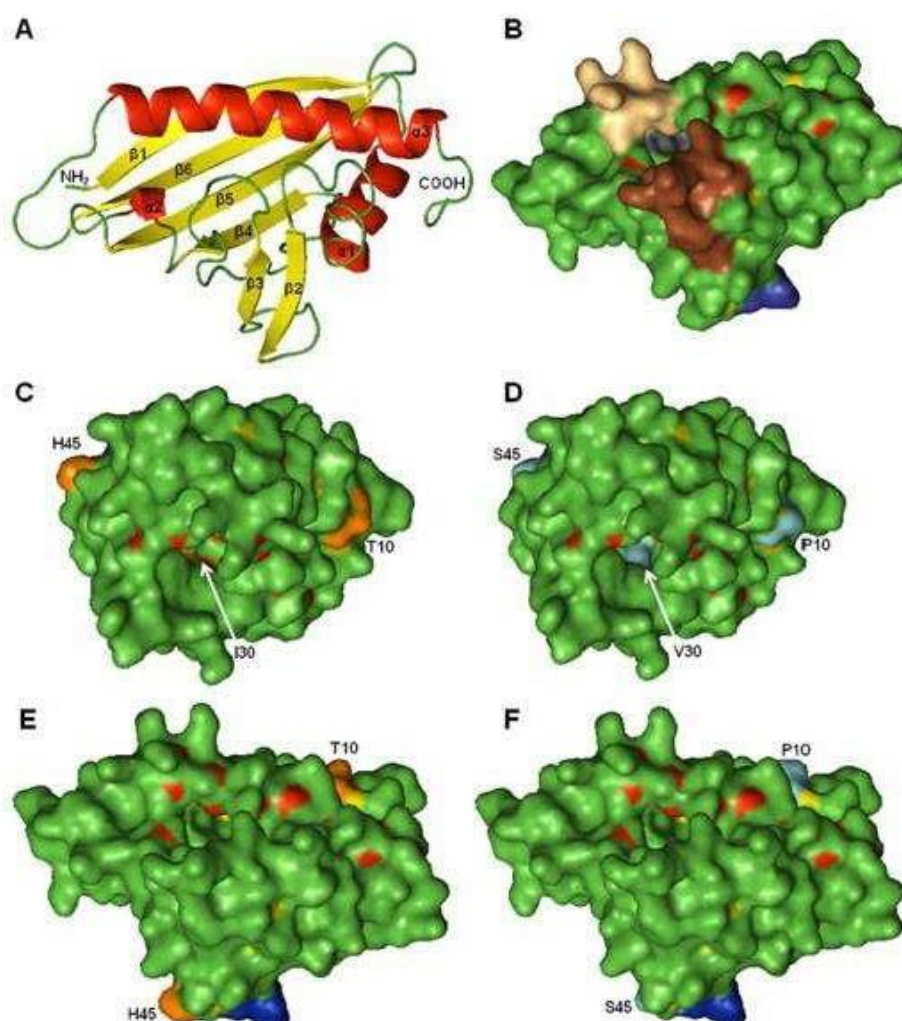


Figura 2: Estrutura tridimensional de TcPR-10 obtida por modelagem de homologia com Pru av1 (Protein Data Bank, 1e09_A). **A.** Elementos da estrutura secundária de TcPR-10: alfa hélice em vermelho; folhas beta em amarelo e P loops em verde. **B.** Superfície molecular de TcPR-10 selvagem com regiões correspondentes de aminoácidos contíguos: 47GDGGVG52 em azul; 59FPEGSHFKY67 em marrom; 116TSHYHT121 em cinza; 129EEEEKKK136 em pêssego. **C e E.** Superfície molecular do tipo selvagem TcPR-10 com aminoácidos para mutações destacadas em laranja (Thr10, Ile30, His45). **D e F.** TcPR-10 tipo mutante com mutações pontuais em azul (Pro10, Val30, Ser45). Fonte: Menezes et al. (2012).

2.4 Proteínas *Heat Shock*-modo de ação

Proteínas *Heat Shock* (HSPs) ou de choque térmico, são chaperonas envolvidas na montagem, dobragem, translocação e endereçamento para degradação de proteínas em processos celulares normais e em situações de

estresse (LINDQUIST; CRAIG, 1988; PARK; SEO, 2015; WANG et al., 2004). As principais famílias em que as HSPs estão classificadas são as HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e as small HSP (sHSP) (WANG et al., 2004). Elas foram inicialmente descritas como proteínas induzidas em choque térmico (LINDQUIST, 1986; RITOSSA, 1962). Essa descrição limita a descrição dessa classe de proteínas, já que são induzidas em uma série de outras tensões bióticas e abióticas contribuindo para a homeostase celular (SILVA et al., 2013; WANG et al., 2004; XU et al., 2016). A localização celular dessas proteínas vai desde o citoplasma até as organelas como núcleo, mitocôndrias, cloroplastos e retículo endoplasmático (BOSTON et al., 1996; WANG et al., 2004).

Em animais, as HSPs foram relacionadas a atuação na resposta imune (TSAN; GAO, 2009). Em plantas, realizam o controle na qualidade de receptores de reconhecimento padrão (PRR) e proteínas R (PARK; SEO, 2015; ZHANG et al., 2004). Além disso, as HSPs foram propostas para sinalização celular em situações de ameaça e tensões celulares (ZHANG et al., 2004). A HSP72 faz parte de um conjunto de moléculas que exercem esse papel fornecendo informações sobre a ameaça, o estressor ou a integridade do tecido ou organismo (WILLIAMS; IRELAND, 20008). A HSP60, provoca resposta proinflamatória em células do sistema imune inato, sinalizando tensão em células estressadas (OHASHI et al., 2000).

A maior parte das HSPs estão localizadas no citoplasma, envolvidas na transferência de sinal celular para o núcleo em situações de tensão (PARK; SEO, 2015). A família das HSP90 é a que possui as funções de imunidade em plantas mais bem caracterizada. Participam de mecanismos de defesa contra agentes patogênicos, regulação da expressão gênica, transporte de proteínas pré-formadas em cloroplastos e resposta ao choque térmico (BREIMAN, 2014; PARK; SEO, 2015).

Em fungos foi visto que a HSP82, membro da família HSP90, é um fator necessário para a virulência de patógenos intracelulares. Foram utilizados mutantes de levedura *Histoplasma capsulatum* com expressão diminuída do gene HSP82, essa condição atenuou a virulência do fungo sobre células de macrófagos (EDWARDS; ZEMSKA; RAPPLEYE, 2011). A chaperona HSP82 também exercem papel na resposta ao dano do DNA e foram associadas a resposta ao estresse causado por ácido acético em leveduras (SAMANFAR et al., 2017; TRUMAN et al.,

2015). Além disso, foi visto que a expressão dessa proteína e da HslU aumenta no fungo *Moniliophthora perniciosa* quando entra em contato com uma proteína relacionada a patogênese PR de cacau (TcPR-10) (SILVA et al., 2013). A HslU, também classificada como uma proteína *Heat Shock*, pertencente à família HSP100 (SAINI et al., 2017; YOO et al., 1996). Constitui a maquinaria proteolítica de HslUV, juntamente com uma peptidase HslV. Tem a função de hidrolisar ATP para realizar o dobramento de proteínas e sua translocação até HslV. Eles reconhecem as proteínas, a desenrolam e depois a translocam para a HslV onde ocorre sua degradação (BAYTSHTOK et al., 2017; BOCHTLER et al., 2000; KNOW et al., 2003). Essas proteínas podem exercer papel importante no processo de resistência em microrganismos (KIM et al., 2013).

2.5 Transportadores de membrana ABC- Snq2

Os transportadores de membrana ABC (ATP- binding cassette) compõe uma superfamília de proteínas que catalisam o transporte de diversos compostos químicos na membrana celular e em algumas organelas, desempenhando papel vital em vários processos da célula (CHAN et al., 2005; DEAN; ALLIKMETS, 2001; DEAN; HAMON; CHIMINI, 2001). A superfamília está subdividida em 7 subfamílias: ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF e ABCG, que exercem diferentes funções de transporte de peptídeos, colesterol, esteroides, ácido biliar e ferro (DEAN; ALLIKMETS, 2001). Essas proteínas são classificadas com base na organização dos seus domínios de ligação ao ATP, conhecidos como NBF (*Nucleotide-binding folds*) (DEAN, 2002). Sua estrutura compreende dois domínios transmembranares e dois de ligação ao ATP citosólicas (GEORGE; JONES, 2012).

Em *Saccharomyces cerevisiae* foram identificadas as subfamílias ABCB, ABCC, ABCD E ABCG. Os ABCGs desempenham um papel importante como transportadores transmembranares de efluxo, eles usam a hidrólise de ATP para catalisar o transporte de diversos substratos, incluindo esteróis (DOYLE et al., 2011; SABNIS et al., 2017; TELBISZ et al., 2014). As Snq2 pertencem a subfamília transportadora ABCG e está envolvido no transporte de múltiplas drogas e resistência a ROS (PAUMI et al., 2009).

A deleção de múltiplos genes ABC incluindo Snq2 tornam a célula de 2 a 200 vezes mais sensível a inúmeros fatores tóxicos, incluindo antifúngicos usados na agricultura (ROGERS et al., 2011). Foi visto que células de levedura mutagênicas, sem a presença do gene para o transportador Snq2, foram mais sensíveis a ação antifúngica da proteína relacionada a patogênese TcPR-10 do que as que possuíam o gene (PUNGARTNIK et al., 2009). Além disso, estudos posteriores mostraram que a internalização e sensibilidade de *S. cerevisiae* a TcPR-10 pode estar associada a esse transportador de membrana (SILVA, 2013).

REFERÊNCIAS

- AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, Wilbert. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v. 97, n. 5, p. 1012-1022, 2005.
- ALMEIDA, Alex-Alan F. de; VALLE, Raúl R. Ecophysiology of the cacao tree. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 4, p. 425-448, 2007.
- ALVERSON, William S. et al. Phylogeny of the core Malvales: evidence from ndhF sequence data. **American Journal of Botany**, v. 86, n. 10, p. 1474-1486, 1999.
- ARGOUT, Xavier et al. The genome of *Theobroma cacao*. **Nature genetics**, v. 43, n. 2, p. 101, 2011.
- ASENSIO, Teresa et al. Novel plant pathogenesis-related protein family involved in food allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n. 4, p. 896-899, 2004.
- BANTIGNIES, Brigitte et al. Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots. **Plant molecular biology**, v. 42, n. 6, p. 871-881, 2000.
- BARAU, Joan et al. Apoplastic and intracellular plant sugars regulate developmental transitions in witches' broom disease of cacao. **Journal of experimental botany**, v. 66, n. 5, p. 1325-1337, 2014.
- BARTLEY, Basil GD. **The genetic diversity of cacao and its utilization**. Cabi, 2005.
- BAYTSHTOK, Vladimir et al. Covalently linked HslU hexamers support a probabilistic mechanism that links ATP hydrolysis to protein unfolding and translocation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 14, p. 5695-5704, 2017.
- BOCHTLER, Matthias et al. The structures of HslU and the ATP-dependent protease HslU-HslV. **Nature**, v. 403, n. 6771, p. 800, 2000.

BOSTON, Rebecca S.; VIITANEN, Paul V.; VIERLING, Elizabeth. Molecular chaperones and protein folding in plants. In: **Post-transcriptional control of gene expression in plants**. Springer, Dordrecht, 1996. p. 191-222.

BOWERS, J. H.; BAILEY, B. A.; HEBBAR, P. K.; SANOGO, S.; LUMSDEN, R. D. The impact of plant diseases on world chocolate production. **Plant Health Progress**, 2001.

BREIMAN, Adina. Plant Hsp90 and its co-chaperones. **Current Protein and Peptide Science**, v. 15, n. 3, p. 232-244, 2014.

BUFE, Albrecht et al. The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. **Planta**, v. 199, n. 3, p. 413-415, 1996.

CAMILLO, Luciana Rodrigues et al. Tc-cAPX, a cytosolic ascorbate peroxidase of *Theobroma cacao* L. engaged in the interaction with *Moniliophthora perniciosa*, the causing agent of witches' broom disease. **Plant physiology and biochemistry**, v. 73, p. 254-265, 2013.

CASAÑAL, Ana et al. The strawberry pathogenesis-related 10 (PR-10) Fra a proteins control flavonoid biosynthesis by binding to metabolic intermediates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 49, p. 35322-35332, 2013.

CHADHA, Pooja; DAS, Rakha H. A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: an insight of its mode of antifungal activity. **Planta**, v. 225, n. 1, p. 213-222, 2006.

CHAN, Wayne et al. Myosin II regulatory light chain is required for trafficking of bile salt export protein to the apical membrane in Madin-Darby canine kidney cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23741-23747, 2005.

CHESSMAN, E. E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. **Trop. Agr**, v. 21, p. 144-159, 1944.

CHONG, Julie et al. Identification, expression analysis and characterization of defense and signaling genes in *Vitis vinifera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 469-481, 2008.

CHRISTENSEN, Anders B. et al. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, n. 3, p. 135-144, 2002.

CUATRECASAS, José. **Cacao and its allies; a taxonomic revision of the genus Theobroma**. 1964.

CUENCA, M. A. G.; NAZÁRIO, C. C. Importância econômica e evolução da cultura do cacau no Brasil e na região dos tabuleiros costeiros da Bahia entre 1990 e 2002. **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Documents (INFOTECA-E)**, 2004.

DA HORA JUNIOR, Braz Tavares 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. 1507-1519, 2012.

DARWICHE, Rabih et al. Plant pathogenesis-related proteins of the cacao fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa* differ in their lipid-binding specificities. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M117. 811398, 2017.

DA SILVA, Leonardo F. et al. Expression of an oxalate decarboxylase impairs the necrotic effect induced by Nep1-like protein (NLP) of *Moniliophthora perniciosa* in transgenic tobacco. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 24, n. 7, p. 839-848, 2011.

DAVIE, J. Hugh. CYTOLOGICAL STUDIES IN THE MALVACEAE AND CERTAIN RELATED FAIVILIES. 1933.

DE OLIVEIRA CEITA, Geruza et al. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Science**, v. 173, n. 2, p. 106-117, 2007.

DEAN, Michael; ALLIKMETS, Rando. Complete characterization of the human ABC gene family. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 33, n. 6, p. 475-479, 2001.

DEAN, Michael; HAMON, Yannick; CHIMINI, Giovanna. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **Journal of lipid research**, v. 42, n. 7, p. 1007-1017, 2001.

DIAS, Cristiano Villela et al. Hydrogen peroxide formation in cacao tissues infected by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant physiology and biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 917-922, 2011.

DOS SANTOS SOARES, Alexandra Martins; MACHADO, Olga Lima Tavares. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 10, 2007.

DOYLE, Michelle J. et al. Abcg2 labels multiple cell types in skeletal muscle and participates in muscle regeneration. **J Cell Biol**, p. jcb. 201103159, 2011.

EBNER, Christof; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, Karin; BREITENEDER, Heimo. Plant food allergens homologous to pathogenesis-related proteins. **Allergy**, v. 56, n. s67, p. 43-44, 2001.

EDWARDS, Jessica A.; ZEMSKA, Olga; RAPPLEYE, Chad A. Discovery of a role for Hsp82 in *Histoplasma* virulence through a quantitative screen for macrophage lethality. **Infection and immunity**, v. 79, n. 8, p. 3348-3357, 2011.

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

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

FERNANDES, Humberto et al. Lupinus luteus pathogenesis-related protein as a reservoir for cytokinin. **Journal of molecular biology**, v. 378, n. 5, p. 1040-1051, 2008.

FERNANDES, Humberto et al. Structural and functional aspects of PR-10 proteins. **The FEBS journal**, v. 280, n. 5, p. 1169-1199, 2013.

FERREIRA, Ricardo B. et al. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 5, p. 677-700, 2007.

FILIPENKO, E. A. et al. PR-proteins with ribonuclease activity and plant resistance against pathogenic fungi. **Russian Journal of Genetics: Applied Research**, v. 3, n. 6, p. 474-480, 2013.

FISTER, Andrew S. et al. Theobroma cacao L. pathogenesis-related gene tandem array members show diverse expression dynamics in response to pathogen colonization. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 363, 2016.

FRISTENSKY, Brian; HOROVITZ, Daniel; HADWIGER, Lee A. cDNA sequences for pea disease resistance response genes. **Plant Molecular Biology**, v. 11, n. 5, p. 713-715, 1988.

FUJIMOTO, Yasuyuki et al. Purification and cDNA cloning of cytokinin-specific binding protein from mung bean (Vigna radiata). **The FEBS Journal**, v. 258, n. 2, p. 794-802, 1998.

GAJHEDE, Michael et al. X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 3, n. 12, p. 1040-1045, 1996.

GARCIA, Odalys et al. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete Moniliophthora perniciosa, the causal agent of witches' broom in Theobroma cacao. **mycological research**, v. 111, n. 4, p. 443-455, 2007.

GEORGE, Anthony M.; JONES, Peter M. Perspectives on the structure–function of ABC transporters: the switch and constant contact models. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 109, n. 3, p. 95-107, 2012.

GESTEIRA, Abelmon S. et al. Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by Moniliophthora perniciosa. **Annals of botany**, v. 100, n. 1, p. 129-140, 2007.

GOMES, Dayane Santos 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, Gareth W. et al. Witches' brooms and frosty pods: threats to world cacao production. **Biologist**, v. 51, n. 2, p. 71-75, 2004.

GRIFFITH, Gareth 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.

GU, Yong-Qiang et al. Tomato transcription factors Pti4, Pti5, and Pti6 activate defense responses when expressed in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 14, n. 4, p. 817-831, 2002.

HALL, CJJ van et al. Cocoa. **Cocoa.**, 1914.

ICCO. (2017). Pests & Diseases. **International Cocoa Organization**. Acesso em: <https://www.icco.org/about-cocoa/pest-a-diseases.html>

JAIN, Deepti et al. A pathogenesis related-10 protein CaARP functions as aldo/keto reductase to scavenge cytotoxic aldehydes. **Plant molecular biology**, v. 90, n. 1-2, p. 171-187, 2016.

JAIN, S.; KUMAR, A. The pathogenesis related class 10 proteins in plant defense against biotic and abiotic stresses. **Adv. Plants Agric. Res**, v. 2, p. 77, 2015.

KARUPPANAPANDIAN, Thirupathi et al. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 709, 2011.

KOISTINEN, K. M. et al. Stress-related RNase PR-10c is post-translationally modified by glutathione in birch. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 6, p. 707-715, 2002.

KWON, Ae-Ran et al. Structure and reactivity of an asymmetric complex between HslV and I-domain deleted HslU, a prokaryotic homolog of the eukaryotic proteasome. **Journal of molecular biology**, v. 330, n. 2, p. 185-195, 2003.

LAGUNIN, Alexey A. et al. Chemo-and bioinformatics resources for in silico drug discovery from medicinal plants beyond their traditional use: a critical review. **Natural product reports**, v. 31, n. 11, p. 1585-1611, 2014.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annual review of genetics**, v. 22, n. 1, p. 631-677, 1988.

LINDQUIST, Susan. The heat-shock response. **Annual review of biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 1151-1191, 1986.

LIU, Jun-Jun; EKRAMODDOULLAH, Abul KM. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 68, n. 1, p. 3-13, 2006.

LIU, Yule et al. Molecular chaperone Hsp90 associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 3, p. 2101-2108, 2004.

MARELLI, Jean-Philippe et al. Infection biology of *Moniliophthora perniciosa* on *Theobroma cacao* and alternate solanaceous hosts. **Tropical Plant Biology**, v. 2, n. 3-4, p. 149-160, 2009.

MARKOVIĆ-HOUSLEY, Zora et al. Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. **Journal of molecular biology**, v. 325, n. 1, p. 123-133, 2003.

MEINHARDT, Lyndel 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.

MENEZES, JA de S.; CARMO-NETO, Dionísio. **A modernização do agribusiness cacau**. Fundação Cargill, 1993.

MENEZES, Sara Pereira et al. Evaluation of the allergenicity potential of TcPR-10 protein from Theobroma cacao. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e37969, 2012.

MENEZES, Sara Pereira et al. The pathogenesis-related protein PR-4b from Theobroma cacao presents RNase activity, Ca²⁺ and Mg²⁺ dependent-DNase activity and antifungal action on Moniliophthora perniciosa. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 161, 2014.

MICHELI, Fabienne et al. Functional genomics of cacao. In: **Advances in botanical research**. Academic Press, 2010. p. 119-177.

MONDEGO, Jorge MC et al. A genome survey of Moniliophthora perniciosa gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 548, 2008.

MONTEIRO, Wilson R.; AHNERT Dário. Melhoria Genética do Cacaueiro. **Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacaueiro**, segunda edição, p. 11-30, 2012.

MOTAMAYOR, J. C., Risterucci, A. M., Lopez, P. A., Ortiz, C. F., Moreno, A., & Lanaud, C. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity**, v. 89, n. 5, p. 380-386, 2002.

MOTAMAYOR, Juan C. et al. The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. **Genome biology**, v. 14, n. 6, p. r53, 2013.

MOTAMAYOR, Juan Carlos et al. Cacao domestication II: progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. **Heredity**, v. 91, n. 3, p. 322-330, 2003.

MOXON, Simon et al. A toolkit for analysing large-scale plant small RNA datasets. **Bioinformatics**, v. 24, n. 19, p. 2252-2253, 2008.

OHASHI, Koji et al. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 2, p. 558-561, 2000.

PARK, Chang-Jin; SEO, Young-Su. Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones for plant immunity. **The plant pathology journal**, v. 31, n. 4, p. 323, 2015.

PAUMI, Christian M. et al. ABC transporters in Saccharomyces cerevisiae and their interactors: new technology advances the biology of the ABCC (MRP) subfamily. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 4, p. 577-593, 2009.

PEREIRA, J. L. et al. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotropica (Brasil)** v. 1 (1) p. 79-81, 1989.

PIERCE, Brian G. et al. ZDOCK server: interactive docking prediction of protein–protein complexes and symmetric multimers. **Bioinformatics**, v. 30, n. 12, p. 1771-1773, 2014.

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, p. 461-472, 2009.

PUNGARTNIK, Cristina et al. High-affinity copper transport and Snq2 export permease of *Saccharomyces cerevisiae* modulate cytotoxicity of PR-10 from *Theobroma cacao*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 22, n. 1, p. 39-51, 2009.

PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. STATUS OF CACAO WITCHES'BROOM: Biology, Epidemiology, and Management. **Annual review of phytopathology**, v. 34, n. 1, p. 573-594, 1996.

QUAN, Li-Juan et al. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 1, p. 2-18, 2008.

RADAUER, Christian; LACKNER, Peter; BREITENEDER, Heimo. The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. **BMC evolutionary biology**, v. 8, n. 1, p. 286, 2008.

RITOSSA, Ferruccio. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, v. 18, n. 12, p. 571-573, 1962.

ROGERS, Bruce et al. The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 207-214, 2001.

RYALS, John A. et al. Systemic acquired resistance. **The plant cell**, v. 8, n. 10, p. 1809, 1996.

SABNIS, Neha G. et al. The Efflux Transporter ABCG2 Maintains Prostate Stem Cells. **Molecular Cancer Research**, v. 15, n. 2, p. 128-140, 2017.

SAINI, Jasleen et al. Heat Shock Proteins and Their Therapeutic Applications: An Overview. **JPBB**, v. 2, n. 1, p. 41, 2017.

SAMANFAR, Bahram et al. The sensitivity of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, to acetic acid is influenced by DOM34 and RPL36A. **PeerJ**, v. 5, p. e4037, 2017.

SANTIAGO, Julia et al. The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. **Nature**, v. 462, n. 7273, p. 665-668, 2009.

SARASTE, Matti; SIBBALD, Peter R.; WITTINGHOFER, Alfred. The P-loop—a common motif in ATP-and GTP-binding proteins. **Trends in biochemical sciences**, v. 15, n. 11, p. 430-434, 1990.

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

SCHENK, Martijn F. et al. Seven different genes encode a diverse mixture of isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen. **BMC genomics**, v. 7, n. 1, p. 168, 2006.

SELS, Jan et al. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 941-950, 2008.

SENA, K.; ALEMANN, L.; GRAMACHO, K. P. The infection process of *Moniliophthora perniciosus* in cacao. **Plant pathology**, v. 63, n. 6, p. 1272-1281, 2014.

SILVA NETO, P. J. da. **Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira**. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Belém, PA (Brasil), 2001.

SILVA, F. A. C. et al. Proteomic response of *Moniliophthora perniciosus* exposed to pathogenesis-related protein-10 from *Theobroma cacao*. **Genet Mol Res**, v. 12, p. 4855-4868, 2013.

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

SILVA, F.A.C. TcPR-10: Mecanismo de transporte e ação em fungos. **Tese de doutorado**. 2013.

SILVA, S. D. V. M. et al. Redescritção da sintomatologia causada por *Crinipellis perniciosus* em cacaueiro. **Agrotropica**, v. 1, p. 1-23, 2002.

SINGER, Rolf et al. A monographic study of the genera *Crinipellis* and *Chaetocalathus*. **Lilloa**, v. 8, 1942.

ŚLIWIAK, Joanna et al. Crystallographic and CD probing of ligand-induced conformational changes in a plant PR-10 protein. **Journal of structural biology**, v. 193, n. 1, p. 55-66, 2016.

SLUSARENKO A.J.; FRASER R.S.S.; VAN LOON L.C. **Mechanisms of Resistance to Plant Diseases**. 620 pp, 2000.

SOMSSICH, Imre E. et al. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 8, p. 2427-2430, 1986.

STAHEL, G. *Marasmius perniciosus* nov. spec. **Dept Landbouw in Suriname Bull**, v. 33, p. 1-27, 1915.

TEIXEIRA, Paulo José Pereira Lima et al. High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosus*. **The Plant Cell**, v. 26, n. 11, p. 4245-4269, 2014.

- TELBISZ, Ágnes et al. Regulation of the function of the human ABCG2 multidrug transporter by cholesterol and bile acids: effects of mutations in potential substrate and steroid binding sites. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 42, n. 4, p. 575-585, 2014.
- THOMAZELLA, Daniela et al. The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. **New Phytologist**, v. 194, n. 4, p. 1025-1034, 2012.
- TRUMAN, Andrew W. et al. The quantitative changes in the yeast Hsp70 and Hsp90 interactomes upon DNA damage. **Data in brief**, v. 2, p. 12-15, 2015.
- VAN LOON, L. C. et al. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, n. 3, p. 245-264, 1994.
- VAN LOON, L. C.; VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN': II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. **Virology**, v. 40, n. 2, p. 199-211, 1970.
- VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 55, n. 2, p. 85-97, 1999.
- VAN LOON, Leendert C. Pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 4, n. 2, p. 111-116, 1985.
- VAN LOON, Leendert C.; REP, Martijn; PIETERSE, Corné MJ. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 44, p. 135-162, 2006.
- WANG, Wangxia et al. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in plant science**, v. 9, n. 5, p. 244-252, 2004.
- WARD, Eric R. et al. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, v. 3, n. 10, p. 1085-1094, 1991.
- WEN, Jun et al. The Potential of *Betv1* Homologues, a Nuclear Multigene Family, as Phylogenetic Markers in Flowering Plants. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 8, n. 3, p. 317-333, 1997
- WENT, Friedrich A. F. C. et al. Krulloten en versteende vruchten van de cacao in Suriname. 1904.
- WICHE, Regina et al. Molecular basis of pollen-related food allergy: identification of a second cross-reactive IgE epitope on Pru av 1, the major cherry (*Prunus avium*) allergen. **Biochemical Journal**, v. 385, n. 1, p. 319-327, 2005.
- WIESE, A. K. et al. Intracellular Oxygen Concentration Determined By Mitochondrial Respiration Regulates Production of Reactive Oxygen Species. **Integr Canc Biol Res**, v. 1, p. 006, 2017.

WILCOX, Lisa J. et al. Transcriptional profiling identifies two members of the ATP-binding cassette transporter superfamily required for sterol uptake in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 36, p. 32466-32472, 2002.

WILLIAMS, John HH; IRELAND, H. Elyse. Sensing danger—Hsp72 and HMGB1 as candidate signals. **Journal of leukocyte biology**, v. 83, n. 3, p. 489-492, 2008.

XIANG, Quanjun; CHENG, Bei; YU, Jiaguo. Graphene-Based Photocatalysts for Solar-Fuel Generation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, n. 39, p. 11350-11366, 2015.

XU, L. et al. The transcriptional coactivator PGC1 α protects against hyperthermic stress via cooperation with the heat shock factor HSF1. **Cell death & disease**, v. 7, n. 2, p. e2102, 2017.

YANG, Yinong; SHAH, Jyoti; KLESSIG, Daniel F. Signal perception and transduction in plant defense responses. **Genes & Development**, v. 11, n. 13, p. 1621-1639, 1997.

YOO, Soon Ji et al. Purification and characterization of the heat shock proteins HslV and HslU that form a new ATP-dependent protease in Escherichia coli. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 24, p. 14035-14040, 1996.

ZHANG, Yan et al. Expression of RPS4 in tobacco induces an AvrRps4-independent HR that requires EDS1, SGT1 and HSP90. **The Plant Journal**, v. 40, n. 2, p. 213-224, 2004.

3. CAPÍTULO 1

Caracterização *in silico* da interação TcPR-10mut-*Moniliophthora perniciosa*:
transporte e mecanismos de defesa do patógeno

Natasha dos Santos Lopes, Sara Pereira Menezes, Bruno Andrade, Raner José Santana Silva, Fabienne Micheli

Contribuição dos autores:

NSL, SPM e FM foram responsáveis pela concepção e design das experiências, análise dos dados e redação do manuscrito; NSL foi responsável pela execução de todas as experiências; BA e RJSS auxiliaram nas análises de bioinformática; FM cedeu a infraestrutura de laboratório de biologia molecular, foi responsável pelo apoio financeiro da pesquisa e pelo aconselhamento de NSL.

Artigo em preparação.

**Caracterização *in slico* da interação TcPR-10mut-*Moniliophthora perniciosa*:
transporte e mecanismos de defesa do patógeno**

Natasha dos Santos Lopes¹, Sara Pereira Menezes¹, Bruno Andrade², Raner José Santana Silva¹, Fabienne Micheli^{1,3}

¹ Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Centro de Biotecnologia e Genética (CBG), Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, 45662-900 Ilhéus-BA, Brazil.

² Universidade Estadual Sudoeste da Bahia (UESB), Av. José Moreira Sobrinho, Jequié, Bahia 45206-190, Brazil.

³ CIRAD, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France.

* Autor correspondente: 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

Abreviaturas: PR: proteína relacionada a patogênese; HSP: proteína de Choque térmico

Palavras-chave: *Docking*; transportadores ABC; TcPR-10mut.

RESUMO

As proteínas relacionadas a patogênese da família 10 (PR-10) possuem homologia com proteínas *Betv 1*, apresentando potencial de alergenicidade. Além disso, apresentam atividade de ribonuclease e antifúngica. Uma PR-10 de *Theobroma cacao* (TcPR-10) foi identificada em uma biblioteca de cDNA na interação cacau-*M. pernicioso*. Sua função de ribonuclease e antifúngica foi caracterizada contra o fungo patogênico *M. pernicioso* e contra *S.cerevisiae*, sendo que a TcPR-10 foi internalizada por ambos organismos. Posteriormente, foram realizadas mutações nessa molécula (TcPR-10mut) para diminuir o seu potencial alergênico, sem interferência nas suas funções. A toxicidade de TcPR-10 foi avaliada em leveduras sem o transportador de membrana Snq2, que mostrou hiperresistência nas leveduras com ausência do transportador. Mais tarde, foi visto que ocorre maior resistência e menor formação de vacúolos em fungos sem transportador Snq2, sugerindo relação desse transportador de membrana com a internalização de TcPR-10 e sua atividade antifúngica. Os patógenos recrutam mecanismos para recuperar a homeostase celular quando são atacados com moléculas tóxicas. Afim de investigar a ação antifúngica da TcPR-10 e sua internalização em células fúngicas, foram realizadas análises de *docking* molecular para verificar a interação entre o transportador ABC (Snq2) e proteínas relacionadas ao estresse (HSP82 e HslU) com a TcPR-10mut. Os dados mostraram que a Snq2 se complexa com TcPR-10mut em seu domínio transmembrana, sugerindo internalização dessa proteína por meio desse transportador. A HSP82 e HslU também interagem com TcPR-10mut em sua cavidade hidrofóbica e no sítio de atividade de ribonuclease, indicando um bloqueio da atividade de TcPR-10 mut e uma sinalização a célula fúngica de perigo.

INTRODUÇÃO

As plantas quando submetidas a estresses biótico e abiótico desenvolvem barreiras complexas para se proteger, induzindo mecanismos de defesa que incluem a expressão de várias moléculas protetoras, dentre essas, as proteínas relacionadas a patogênese (PR) (FILIPENKO et al., 2013; JAIN et al., 2015). O acúmulo dessas proteínas pode estar associado a resposta de hipersensibilidade (HR) e a Resistência adquirida sistêmica (SAR) (FILIPENKO et al., 2013; GUEVARA-MORATO et al., 2010; VAN LOON et al., 1994). As proteínas PR foram classificadas em 17 famílias com base nas suas características estruturais e atividade biológica, incluindo as quitinases (SELS et al., 2008), ribonucleases (ZHOU et al., 2002) e de ação antifúngica (SELS et al., 2008; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006; VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

Dentre as famílias PR, os membros da família PR-10 se destacam como um grupo de pequenas proteínas ácidas que apresentam uma região altamente conservada, chamada de motivo P-loop, rico em glicina (GXGGXGXXK- aminoácido 47-55). Esse motivo caracteriza alguns membros da família com atividade de ribonuclease, sendo conservado em proteínas de grãos de pólen, como a *Betv 1* (*Betula verrucosa*), conferindo a essas moléculas potencial de alergenicidade (CHADHA; DAS, 2006; GAJHEDE et al., 1996; JAIN; KUMAR, 2015; MARKOVIĆ-HOUSLEY et al., 2003; MENEZES et al., 2012). As PR-10 foram relatadas atuando na inibição ao crescimento de fungos patogênicos, sugerindo que a atividade de ribonuclease pode estar associada a sua ação antifúngica (FILIPENKO et al., 2013; LAN; NG, 2001). Embora seja feita relação entre essas funções, muito pouco se sabe sobre a internalização das proteínas PR-10 e envolvimento da atividade de ribonuclease na ação antifúngica.

A doença vassoura-de-bruxa, que atinge o cacaueteiro é causada pelo fungo hemibiotrófico *Moniliophthora perniciosa*. Essa doença é responsável por perdas significativas no cultivo do cacau e graves impactos econômicos (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005). O gene *TcPR-10* foi identificado a partir de uma biblioteca de cDNA da interação cacau-*M. perniciosa* (GESTEIRA et al., 2007). Pungartnik et al. (2009) relataram sua atividade de ribonuclease e antifúngica em *Saccharomyces cerevisiae* e *M. perniciosa*. Além disso, mostraram a internalização da TcPR-10 por ambos os

fungos, sugerindo uma importação ativa dependente de energia e temperatura. Sua toxicidade mostrou ser diminuída em leveduras mutadas, sem o transportador de membrana Snq2. Silva (2013) verificou a formação de vacúolos em células fúngicas em contato com a TcPR-10, todavia, o genótipo com ausência do transportador de membrana Snq2 teve diminuição significativa da formação vacuolar (SILVA, 2013). Esses dados sugerem que a internalização da proteína PR-10 de cacau pode estar diretamente relacionada com esse transportador.

Os transportadores de membrana ABC, catalisam o transporte de diversas substâncias na membrana celular e algumas organelas (CHAN et al., 2005; DEAN; ALLIKMETS, 2001; DEAN; HAMON; CHIMINI, 2001; GEORGE; JONES, 2012). A subfamília ABCG, da qual faz parte o Snq2, tem função de transporte de uma série de drogas tóxicas e esterol, além de estar relacionado a resistência a ROS (espécies reativas de oxigênio) (PAUMI et al., 2009; WILCOX et al., 2002). Leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) contém 16 genes que codificam transportadores ABC (ROGERS et al., 2001). Alguns deles estão envolvidos na resistência a drogas pleiotrópicas (PDR) (WOLFGER; MAMNUN; KUCHLER, 2001). Assim, *S. cerevisiae* pode ser utilizado como um modelo para estudos relacionados a esses transportadores.

Agentes tóxicos que entram em células fúngicas ativam mecanismos que tentam reestabelecer a homeostase celular (KILARU; BAILEY; HASENSTEIN, 2007; SILVA et al., 2013). Ao ser internalizada por *M. pernicioso*, a TcPR-10 parece causar estresse oxidativo na célula fúngica, recrutando proteínas relacionadas ao estresse como as *heat Shock proteins* (30-60 min de interação) (SILVA et al., 2013). As HSP são chaperonas moleculares encontradas em todos os organismos em condições normais e sob estresses bióticos e abióticos, atuando na resposta imune de plantas e animais. Atuam na montagem, dobragem, translocação e endereçamento para degradação de proteínas além de estarem envolvidas na sinalização celular estabilizando receptores presentes no citoplasma, por exemplo (FARIA; LONGUI, 2006; LINDQUIST; CRAIG, 1988; PARK; SEO, 2015; WANG et al., 2004).

Em fungos quando HSP82 tem sua expressão reduzida isso atenua a virulência do *Histoplasma capsulatum* (EDWARDS; ZEMSKA; RAPPLEYE, 2011). Essas proteínas respondem a diversas tensões celulares como dano ao DNA e

estresses abióticos (SAMANFAR et al., 2017; TRUMAN et al., 2015). Já as HslU, hidrolisam ATP para realizar a dobragem e o transporte de proteínas que serão degradadas (BAYTSHTOK et al., 2017; BOCHTLER et al., 2000; KNOW et al., 2003). Ambas HSP82 e HslU se acumularam em *Moniliophthora perniciosa* quando o fungo foi colocado em contato com a TcPR-10 (SILVA et al., 2013). Foram realizadas mutações em 3 aminoácidos da TcPR-10 (TcPR-10mut) que diminuiram seu potencial de alergenicidade, sem interferência na sua atividade de ribonuclease e antifúngica (MENEZES et al., 2012). Assim, o objetivo dessa pesquisa foi investigar *in silico* a atuação da TcPR-10mut em *M. perniciosa* com base em seus mecanismos de transporte e ação antifúngica, bem como, compreender as respostas que essa interação desencadeia no fungo.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Triagem de proteínas diferencialmente expressas em *Moniliophthora perniciosa* na interação com TcPR-10

A interação do fungo *Moniliophthora perniciosa* com a proteína TcPR-10 revelou via análise de gel bidimensional 191 proteínas sendo diferencialmente expressas no fungo. Dessas, 55 foram identificadas, sendo que 16 foram classificadas por Silva et al. (2013), relacionadas com a resposta ao estresse (Tabela 1). Foi realizada uma triagem dessas 16 proteínas no *NCBI*, com o código de acesso disponível no artigo de Silva et al. (2013). Aquelas que possuíam modelo cristalografado, coletamos o arquivo no PDB; já aquelas que não tinham modelo disponível, modelamos através da ferramenta online *Swiss-Model* (<https://swissmodel.expasy.org/>).

Tabela 1. Proteínas relacionadas ao estresse, com base na classificação de Silva et al (2013)

Código (NCBI)	Nome da proteína	MW	pI
P43773	ATP-dependent protease ATPase	23	8.5
P15019	Transaldolase Pentose-phosphate shunt	32	6.2
P02829	Heat shock protein 82	35	4.2

Q9RA63	Chaperone protein ClpB	38	6.4
P32318	Thiazole synthase Suicide enzyme	38	6.4
Q01877	Heat shock protein HSS1	68	5.0
P16474	78-kDa glucose-regulated protein homolog	75	4.7
P54651	Heat shock cognate 90-kDa	84	4.9
Q01877	Heat shock protein HSS1	72	6.7
O74225	Heat shock protein Hsp88	100	6.0
O74770	Probable phosphoketolase	24	5.9
O42766	14-3-3 protein homolog	23	6.9
P17820	Chaperone protein DnaK subunit HslU (heat shock)	64	6.5
P82610	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate; homocysteine methyltransferase	90	7.7
P55737	Heat shock protein 90-2	124	4.8
P32318	Thiazole synthase	48	6.4

De acordo com Silva et al (2013).

2. Obtenção do modelo tridimensional da TcPR-10mut

O modelo tridimensional da proteína TcPR-10mut foi disponibilizado por Menezes et al. (2012). A modelagem por homologia dessa proteína foi realizada utilizando como molde a estrutura tridimensional cristalográfica de *Pru av 1* (PDB: 1e09) (MENEZES et al., 2012).

3. Modelagem molecular

A sequência do transportador de membrana Snq2, do organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*, foi coletada no *NCBI (GenBank: CAA98831.1)*. Para selecionar o melhor modelo 3-D para modelagem molecular dos domínios da proteína Snq2, a sua sequência de aminoácidos foi submetida a uma construção de modelos através da ferramenta online *Swiss-Model* (<https://swissmodel.expasy.org/>). Os domínios 1 e 2 da proteína de transporte ABC Snq2 foram modelados por homologia, utilizando como molde a estrutura 3D do transportador de membrana ABCG2 (PDB: 5nj3), com base no melhor alinhamento com estruturas depositadas no *Protein Data Bank*. Os modelos 3-D dos domínios previstos que obtiveram melhor qualidade foram salvos para as análises posteriores. A qualidade estereoquímica

desses modelos foi avaliada utilizando ferramentas de validação do próprio *Swiss-Model*, incluindo o *Procheck* (LASKOWSKI et al., 1993) e o *Atomic Non-Local Environment Assessment* (ANOLEA).

4. Docking molecular: interação proteína/proteína

A análise de interação foi realizada usando o pacote de ferramentas online *ClusPro* (<https://cluspro.bu.edu/login.php>) (COMEAU et al., 2004). As estruturas 3D da proteína receptora e das proteínas ligantes foram combinadas em um único arquivo PDB. Posteriormente os arquivos dos complexos foram submetidos ao servidor. A predição dos sítios ativos foi realizada pelo servidor *Interpro* (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (ZDOBN OV; APWEILER, 2001) e com base nos artigos que descrevem as estruturas cristalográficas de proteínas homólogas. Os resultados das interações foram avaliados, considerando as nove melhores posições de acoplamento, de acordo com fatores físico-químicos de energia livre, bem como possíveis regiões de sítios ativos e/ou modulatórios, utilizando os programas *PyMOL* 1.8 (DELANO, 2002) e *Discovery Studio* 2017 R2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Interação de proteínas *Heat shock* com TcPR-10mut

A modelagem da TcPR-10mut (Figura 1A-B) mostrou a presença estrutural de seis folhas beta, três alfa hélices e um motivo *P-loop* rico em glicina (47GDGGVGSIK55) responsável por sua atividade de ribonuclease, além de regiões conservadas próximas a cavidade hidrofóbica dessa proteína (59FPEGSHFKY67; 116TSHYHT121; 129EEEIKAGK136) (MENEZES et al., 2012).

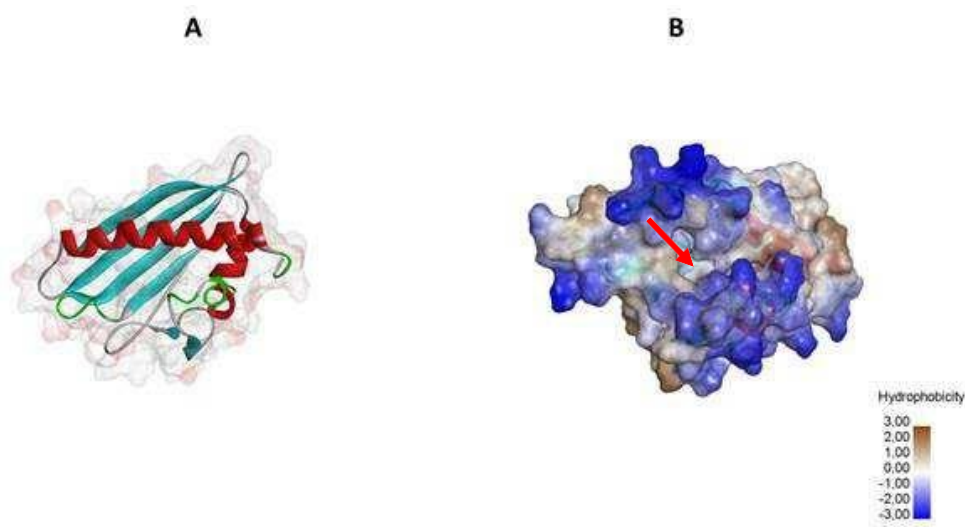


Figura 1: Estrutura tridimensional de TcPR-10mut obtida por modelagem de homologia com Pru av1 disponível no *RCSB Protein Data Bank* (PDB: 1e09_A) (MENEZES et al., 2012). **A. Elementos estruturais. As alfa hélices estão representadas em vermelho e as folhas beta em azul. **B.** Superfície molecular da TcPR-10mut indicando regiões com graus de hidrofobicidade: baixos níveis de hidrofobicidade em azul e altos níveis de hidrofobicidade em marrom. A seta indica a cavidade hidrofóbica da proteína.**

Com base no estudo realizado por SILVA et al. (2013) foi possível selecionar, dentro da classe de proteínas relacionadas ao estresse expressas por *Moniliophthora perniciosa*, proposta pelo autor, duas proteínas que se complexam com a TcPR-10mut. Os modelos cristalográficos da HSP82 (*ATP-dependent molecular chaperone HSP82*) (PDB: 4CE3) e da subunidade HslU (*ATPase subunit HslU*) (PDB: 1OFI) foram utilizados nas análises moleculares de interação em conjunto com a TcPR-10mut, obtida a partir de modelagem com Pru av1 (PDB: 1e09_A) (MENEZES et al., 2012). O modelo tridimensional da HSP82 mostrou uma estrutura com três alfa hélices e oito folhas beta (Figura 2A). Foi identificada uma cavidade hidrofóbica próxima a regiões de domínios conservados. Propõem-se que essa cavidade contém os sítios de ligação ao ATP, magnésio (Mg^{2+}) e um motivo rico em glicina, descritos para essa proteína (Figura 2B), (IMMORMINO et al., 2004; OBERMANN et al., 2014; PRODROMOU et al., 1997).

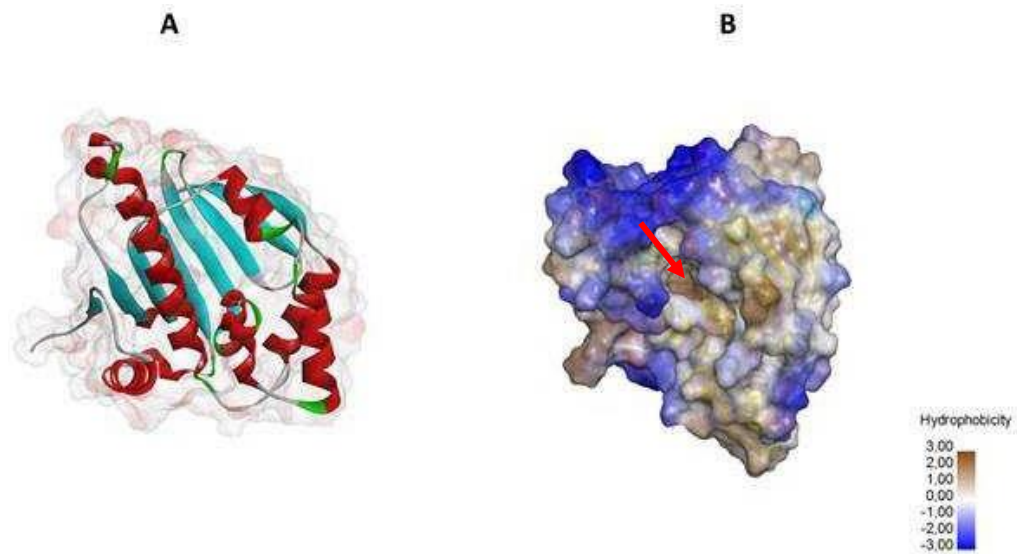


Figura 2: Estrutura tridimensional da HSP82 obtida no *RCSB Protein Data Bank* (PDB: 4CE3). **A.** Elementos que compõem a estrutura. As alfa hélices estão indicadas em vermelho e as folhas beta em azul. **B.** Superfície molecular da HSP82 indica regiões com baixos níveis de hidrofobia em azul e altos níveis de hidrofobia em marrom; seta indica a cavidade hidrofóbica da proteína.

O modelo tridimensional da HslU mostrou uma estrutura com nove alfa hélices e oito folhas beta (Figura 3A). A análise da superfície molecular hidrofóbica identificou uma cavidade hidrofóbica que contém motivos P-loop ricos em glicina, sítios de ligação ao ATP e ao magnésio (Mg^{2+}) (Figura 3B) (KNOW et al., 2003).

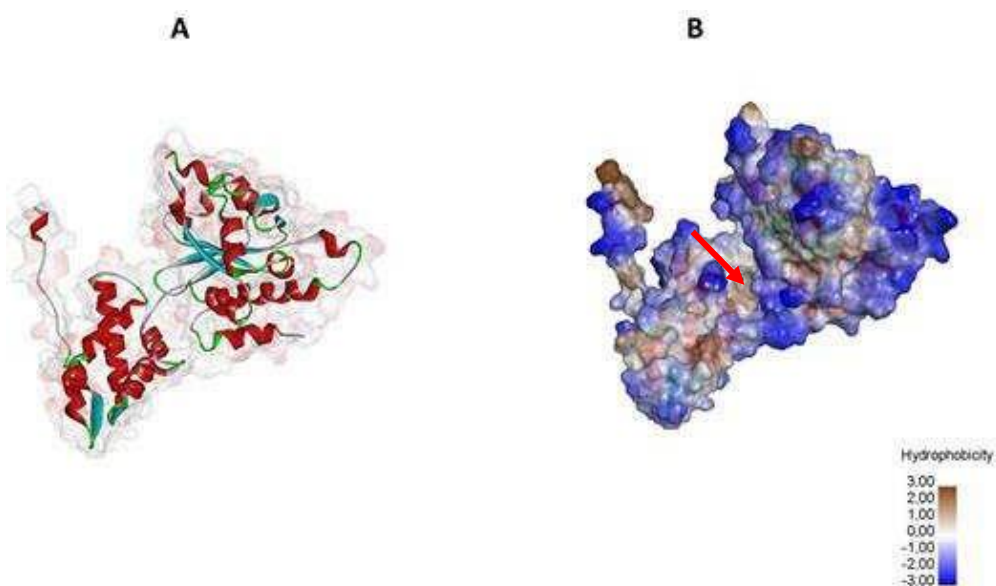


Figura 3: Estrutura tridimensional da HslU obtida no *RCSB Protein Data Bank* (PDB: 1OFI). A. Elementos estruturais: alfa hélices estão representadas em vermelho e folhas beta em azul. **B.** Superfície molecular da HslU indicando regiões com graus de hidrofobicidade: baixos níveis de hidrofobicidade em azul e altos níveis de hidrofobicidade em marrom; seta indica a cavidade hidrofóbica da proteína.

A predição dos domínios e sítios de ligação das proteínas, realizada pelo *Interpro*, confirmou regiões descritas nas cristalografias e realizou a predição de novos sítios. O *docking* revelou interação do motivo *P-loop* da TcPR-10mut (receptor) com a proteína HSP82 (ligante) nos resíduos de aminoácidos Asp48-Arg32, Gly49-Gln119, Val51-Arg32, Val51-Glu33, Gly52-Ser198, Gly52-His197, Ile54-Phe200 sendo que, a interação Val51-Glu33 ocorre no sítio de ambas proteínas (Figura 4); e da cavidade hidrofóbica da TcPR-10mut (receptor) com a proteína HslU nos resíduos de aminoácidos Phe59-Arg441, Leu68-Arg441, Asn70-Ser440, Thr85-Arg441, Val90-Phe442, Tyr100-Phe442, Tyr100-441 Leu102-Leu444, Tyr119-Phe442, Gln138-Ser440, Gln134-Phe442, Leu102-Leu444, Met115-Leu444, Ala134-Leu439, Ala139-Ile443, Ala139-Leu444, Met142-Leu444 (Figura 5).

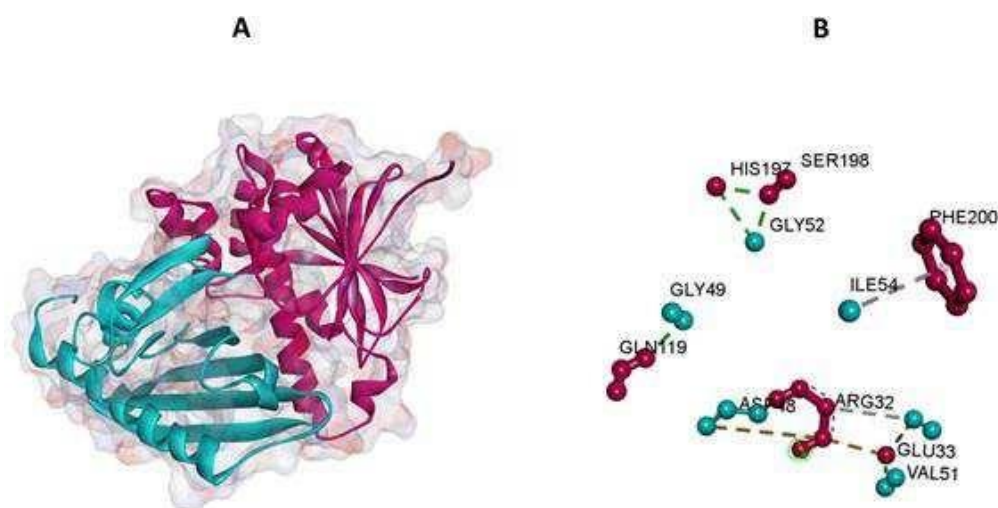


Figura 4: Resultado da análise de interação entre proteínas TcPR-10mut e HSP82 por *Docking*. A. Superfície molecular com proteínas complexadas; TcPR-10mut indicada em azul (receptor) e HSP82 indicada em rosa (ligante). **B.** Representação dos resíduos de aminoácidos onde ocorreu interação.

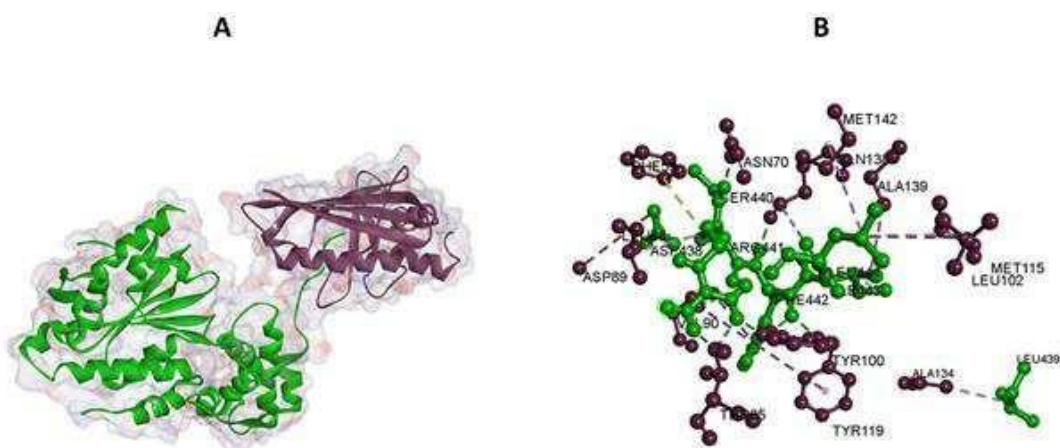


Figura 5: Resultado da análise de interação entre proteínas TcPR-10mut e HslU por *Docking*. **A.** Superfície molecular com proteínas complexadas; TcPR-10mut indicada em roxo (receptor) e HslU indicada em verde (ligante). **B.** Representação dos resíduos de aminoácidos onde ocorreu interação.

A HSP82 e HslU são proteínas *Heat shock* (HSPs) que funcionam como chaperonas presentes na célula em condições normais, sendo induzidas em situações de estresse biótico e abiótico (PARK; SEO, 2015). Atuam principalmente na síntese, segmentação, maturação e degradação de proteínas em todos os compartimentos celulares, se ligando a proteínas estruturalmente instáveis (BOSTON et al., 1996). Em uma análise da interação da proteína TcPR-10 com *Moniliophthora perniciosa*, as proteínas HSPs tiveram seus níveis de expressão elevados em relação ao tratamento controle, principalmente nos tempos entre 30 e 60 minutos. Essas proteínas foram agrupadas na classe que mais se destacou durante a interação (SILVA et al., 2013). Os resultados do *Docking* sugerem que a TcPR-10mut se complexa com duas dessas proteínas, expressas pelo fungo *M. perniciosa*. Uma vez que a TcPR-10 possui atividade de ribonuclease (PUNGARTNIK et al., 2009) e a degradação de RNA pode levar ao estresse oxidativo (MROCZEK; KUFEL, 2008) a presença da TcPR-10 no fungo induz estresse oxidativo gerando mudanças na homeostase celular do fungo. Essa mudança induz a expressão de genes de HSPs (SILVA et al., 2013). Propõe-se que na tentativa de bloquear as funções de ribonuclease e antifúngica da TcPR-10, as

HSPs interagem com o sítio ativo dessa proteína para impedir a sua atividade dentro da célula. A TcPR-10 também atua tentando bloquear a ação das HSPs, esse mecanismo é sugerido pela interação dessa proteína no sítio de ligação da HSP82. TcPR-10 demonstrou ter papel importante no processo de virulência em fungos. Mutantes para o gene HSP82 de *Histoplasma capsulatum* tiveram decréscimo na sua virulência e viabilidade quando submetidos a estresse oxidativo (EDWARDS et al., 2011). Assim como a HslU que exerce papéis importantes no processo de resistência em microorganismos (KIM et al., 2013). O contato da TcPR-10 com *M. perniciosus* promove, em 120 minutos de interação, aumento na expressão de oxirredutases e diminuição dos níveis da proteína TcPR-10 (SILVA et al., 2013). Sabendo que as HSPs estão envolvidas na transferência de sinais celulares ao núcleo sob condições de estresse biótico e abiótico (BOSTON et al., 1996; BREIMAN, 2014), a interação das proteínas HSPs com TcPR-10 pode estar funcionando como uma sinalização de perigo a célula fúngica, que responde induzindo meios de desintoxicar a célula.

2. Interação da proteína TcPR-10mut com transportador de membrana Snq2

Os domínios 1 e 2 da proteína de transporte ABC Snq2 foram modelados por homologia, utilizando como molde a estrutura 3D do transportador de membrana ABCG2 (PDB: 5nj3), com base no melhor alinhamento com estruturas depositadas no *Protein Data Bank* (Figura 6). O modelo de ABCG2 apresentou para os domínios 1 e 2, 28.45% e 28.60% de identidade com a proteína Snq2, respectivamente (Figura 6A); A análise de validação pelo gráfico de Ramachandran dos modelos, apresentou 85% de resíduos nas regiões mais favorecidas e 12.4% em regiões permitidas adicionais, indicando 97.4% resíduos de aminoácidos localizados em regiões favorecidas, no domínio 1; e 86.7% de resíduos nas regiões mais favorecidas e 11.9% em regiões permitidas adicionais, indicando 98.6% resíduos de aminoácidos localizados em regiões favorecidas, no domínio 2. O modelo tridimensional do domínio 1 (Figura 7A-B) de Snq2 mostrou uma região composta por seis folhas beta que foram propostas como um domínio citoplasmático com características pouco hidrofóbicas; uma região com seis alfa hélices propostas como

[illegible]

Figura 7: Representação do modelo tridimensional do domínio 1 do transportador ABC Snq2. **A.** Modelo 3-D do domínio 1 da proteína Snq2; Em amarelo está representado o domínio citoplasmático e em vermelho o domínio transmembrana da proteína. **B.** Superfície molecular hidrofóbica; níveis mais elevados de marrom indicam regiões mais hidrofóbicas e níveis da coloração em azul indicam regiões menos hidrofóbicas. A seta indica a região com maior nível de hidrofobicidade.

O modelo tridimensional do domínio 2 de Snq2 mostrou uma região composta por nove folhas beta que também foram propostas como um domínio citoplasmático com características pouco hidrofóbicas; e uma região com cinco alfa hélices propostas como um domínio transmembrana muito hidrofóbico, além de sítios para ligação ao ATP (Figura 8A-B). As proteínas Snq2 fazem parte da superfamília dos transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), sendo responsáveis pelo transporte de diversos compostos químicos nas membranas celulares (DEAN; HAMON; CHIMINI, 2001; CHAN et al., 2005). Sua classificação se baseia na organização dos seus domínios NBFs (*nucleotide-binding folds*), de ligação ao ATP e a nucleotídeos. Os NBFs apresentam motivos Walker A e B, separado por aproximadamente 90-120 aminoácidos, encontrados em todas as proteínas de ligação ao ATP (DEAN, 2002; HYDE et al., 1990).

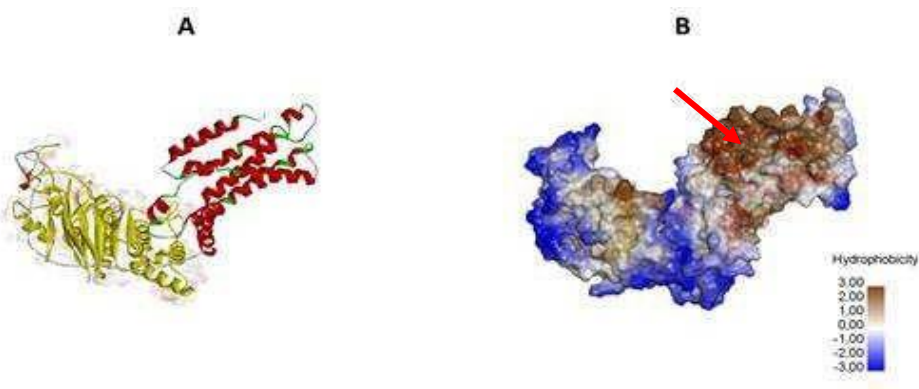


Figura 8: Representação do modelo tridimensional do domínio 2 do transportador ABC Snq2. **A.** Modelo 3-D do domínio 2 da proteína Snq2. Em amarelo está representado o domínio citoplasmático e em vermelho o domínio transmembrana da proteína. **B.** Superfície molecular hidrofóbica; níveis mais elevados de marrom indicam regiões mais hidrofóbicas e níveis mais elevados de azul indicam regiões menos hidrofóbicas. Seta indicando região com maior nível de hidrofobicidade.

TcPR-10mut (ligante) com os domínios da Snq2 (receptor) nos resíduos de aminoácidos do domínio 1: Thr85-Trp501, Gly50-Lys505, Val51-Leu506, Gly52-Lys505, Gly52-Glu502, Ser53-Lys505, Ser53-Glu502, Cys81-Gln509 (Figura 9A-B); E do domínio 2: Ile54-Trp1184 (Figura 10A-B). Já foi relatado que mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* sem transportadores de membrana Snq2 reduziram a presença intracelular de TcPR-10 gerando resistência melhorada ao fungo (PUNGARTNIK et al., 2009). Além disso, foi visto que ocorre internalização de TcPR-10 pelas hifas de *M. perniciosus* com formação de estruturas similares a vacúolos, padrão semelhante foi encontrado em *S. cerevisiae* (SILVA, 2013). Nossos resultados apontam que a proteína TcPR-10 se complexa com a proteína de transporte Snq2 principalmente nas regiões do domínio transmembrana. Assim, podemos inferir que a internalização dessa proteína, pode estar relacionada com esse transportador. As Snq2 pertencem a família transportadora ABCG (PAUMI et al., 2009). Os ABCGs desempenham um papel importante como transportadores transmembranares de efluxo, eles usam a hidrólise de ATP para catalisar o transporte de esteróides (SABNIS et al., 2017; TELBISZ et al., 2014). Foi visto que proteínas da família PR-10, possuem uma cavidade hidrofóbica que se liga a brassinosteróides, esteróides que regulam o desenvolvimento vegetal (KOISTINEN et al., 2005; MARKOVIC-HOUSLEY et al., 2003). Silva (2013) sugere, que devido a essa mesma afinidade ao esterol, a TcPR-10 associada ao esterol da membrana passa através de permeases presentes na membrana celular. Assim, propomos que a importação de TcPR-10 para a célula fúngica está relacionada à sua interação com o transportador de membrana Snq2 e que esse transporte pode estar ocorrendo de forma semelhante a importação de esterol, como proposto por Silva (2013). A presença de um homólogo de Snq2 em *M. perniciosus* indica que podem ocorrer padrões, relacionados a esse transportador, semelhante ao encontrado em *S. cerevisiae* (SANTOS et al., 2008).

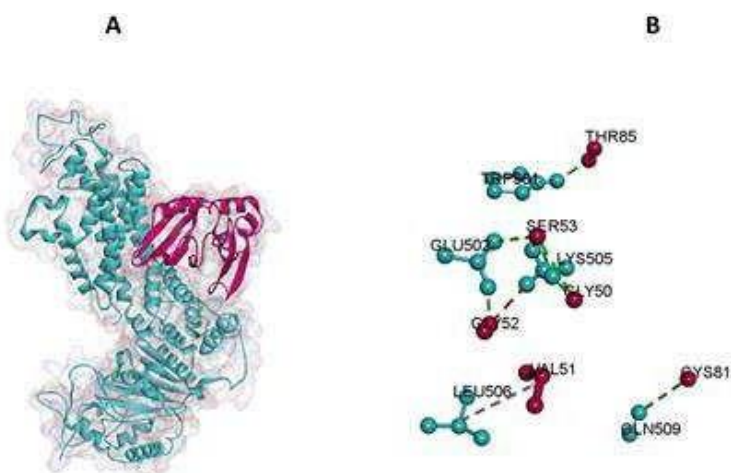


Figura 9: Resultado da análise de interação entre proteínas por *Docking*. **A.** Superfície molecular com proteínas complexadas; TcPR-10mut indicada em rosa (ligante) e domínio 1 da Snq2 indicada em verde (receptor). **B.** Representação dos resíduos de aminoácidos onde ocorreu interação.

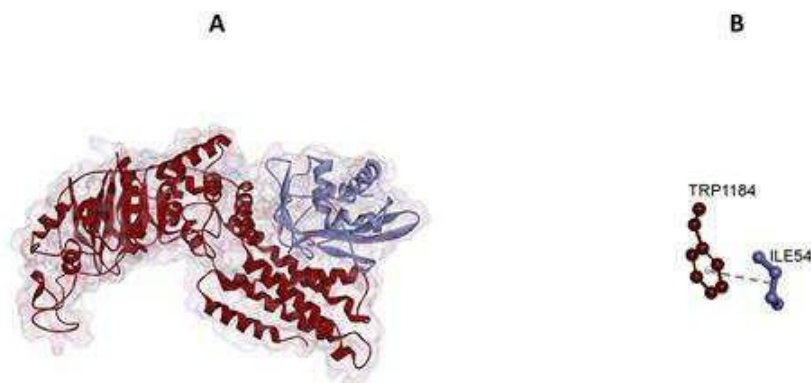


Figura 10: Resultado da análise de interação entre proteínas por *Docking*. **A.** Superfície molecular com proteínas complexadas; TcPR-10mut indicada em lilás (ligante) e domínio 2 da Snq2 indicada em vermelho (receptor). **B.** Representação dos resíduos de aminoácidos onde ocorreu interação.

CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo realizado com análise de interação da TcPR-10mut com proteínas *Heat Shock* e transportadores de membrana ABCG (Snq2).

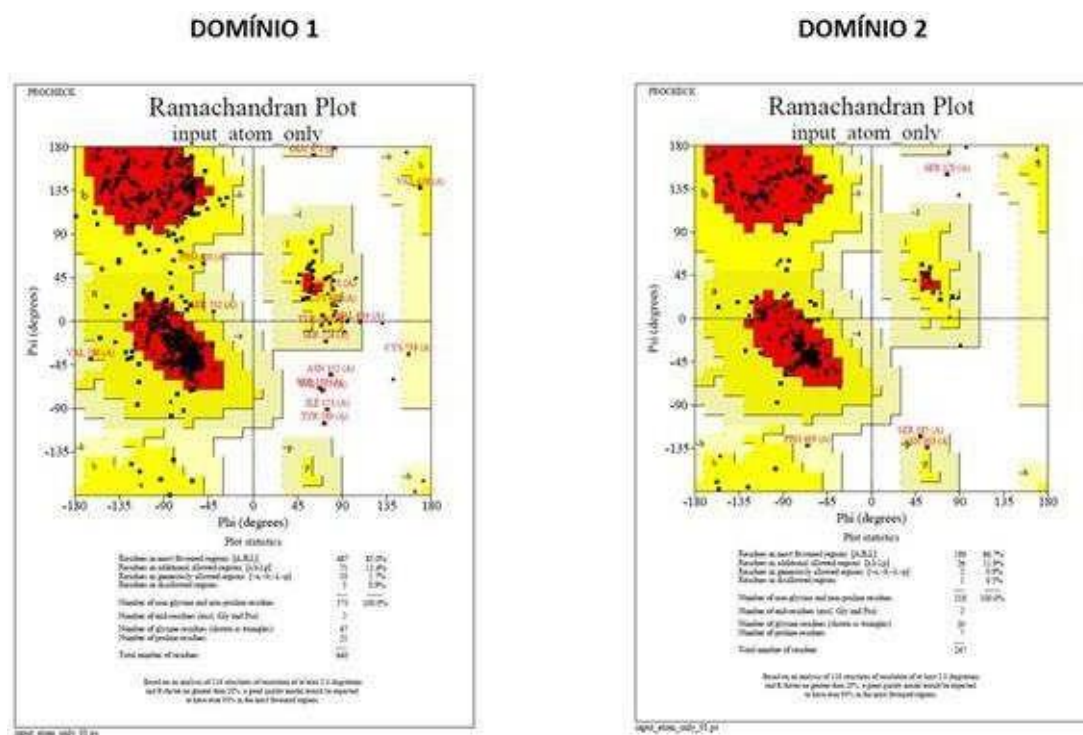
Propomos que as proteínas *Heat Shock* (HSP82 e HslU) de *Moniliophthora perniciosa* se complexam com a TcPR-10mut no seu sítio de atividade de RNase e na sua cavidade hidrofóbica, indicando formas de ação dessas proteínas em bloquear a ação da TcPR-10mut. Essa interação pode estar sinalizando a célula do fungo a indução da expressão de proteínas de defesa, como as oxiredutases.

O transportador de membrana Snq2 e a proteína TcPR10mut interagem no domínio transmembrana do transportador. Pode-se dizer que a internalização da TcPR-10 na célula fúngica está relacionada a um complexo formado por essa interação. E a afinidade de ligação a esteróis dessas duas proteínas medeia esse processo.

Esses dados são importantes para futuros estudos relacionados aos mecanismos de ação da TcPR-10mut no patossistema cacau-*Moniliophthora perniciosa*.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Material suplementar 1: Gráfico de Ramachandran para validação da estrutura dos domínios 1 e 2 da Snq2.



REFERÊNCIAS

- BOSTON, Rebecca S.; VIITANEN, Paul V.; VIERLING, Elizabeth. Molecular chaperones and protein folding in plants. In: **Post-transcriptional control of gene expression in plants**. Springer, Dordrecht, 1996. p. 191-222.
- BREIMAN, Adina. Plant Hsp90 and its co-chaperones. **Current Protein and Peptide Science**, v. 15, n. 3, p. 232-244, 2014.
- CHADHA, Pooja; DAS, Rakha H. A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: an insight of its mode of antifungal activity. **Planta**, v. 225, n. 1, p. 213-222, 2006.
- CHAN, Wayne et al. Myosin II regulatory light chain is required for trafficking of bile salt export protein to the apical membrane in Madin-Darby canine kidney cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23741-23747, 2005.
- COMEAU, Stephen R. et al. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. **Bioinformatics**, v. 20, n. 1, p. 45-50, 2004.
- DEAN, Michael; ALLIKMETS, Rando. Complete characterization of the human ABC gene family. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 33, n. 6, p. 475-479, 2001.
- DEAN, Michael; HAMON, Yannick; CHIMINI, Giovanna. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **Journal of lipid research**, v. 42, n. 7, p. 1007-1017, 2001.
- DELANO, Warren Lyford. PyMOL. 2002.
- EDWARDS, Jessica A.; ZEMSKA, Olga; RAPPLEYE, Chad A. Discovery of a role for Hsp82 in Histoplasma virulence through a quantitative screen for macrophage lethality. **Infection and immunity**, v. 79, n. 8, p. 3348-3357, 2011.
- FARIA, Cláudia DC; LONGUI, Carlos Alberto. Aspectos moleculares da sensibilidade aos glicocorticoides. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.50, n. 6, p. 983-995, 2006.
- FILIPENKO, E. A. et al. PR-proteins with ribonuclease activity and plant resistance against pathogenic fungi. **Russian Journal of Genetics: Applied Research**, v. 3, n. 6, p. 474-480, 2013.
- GAJHEDE, Michael et al. X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 3, n. 12, p. 1040, 1996.
- GEORGE, Anthony M.; JONES, Peter M. Perspectives on the structure–function of ABC transporters: the switch and constant contact models. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 109, n. 3, p. 95-107, 2012.
- GUEVARA-MORATO, Maria Ángeles et al. Characterization of a pathogenesis-related protein 4 (PR-4) induced in Capsicum chinense L3 plants with dual RNase and DNase activities. **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 12, p. 3259-3271, 2010.

HYDE, Stephen C. et al. Structural model of ATP-binding proteing associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. **Nature**, v. 346, n. 6282, p. 362, 1990.

IMMORMINO, Robert M. et al. Ligand-induced conformational shift in the N-terminal domain of GRP94, an Hsp90 chaperone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 44, p. 46162-46171, 2004.

JAIN, S.; KUMAR, A. The pathogenesis related class 10 proteins in plant defense against biotic and abiotic stresses. **Adv. Plants Agric. Res**, v. 2, p. 77, 2015.

KILARU, Aruna; BAILEY, Bryan A.; HASENSTEIN, Karl H. Moniliophthora perniciosa produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. **FEMS microbiology letters**, v. 274, n. 2, p. 238-244, 2007.

KIM, Jisun et al. Indole toxicity involves the inhibition of adenosine triphosphate production and protein folding in Pseudomonas putida. **FEMS microbiology letters**, v. 343, n. 1, p. 89-99, 2013.

KOISTINEN, Kaisa M. et al. Birch PR-10c interacts with several biologically important ligands. **Phytochemistry**, v. 66, n. 21, p. 2524-2533, 2005.

KWON, Ae-Ran et al. Structure and reactivity of an asymmetric complex between HslV and I-domain deleted HslU, a prokaryotic homolog of the eukaryotic proteasome. **Journal of molecular biology**, v. 330, n. 2, p. 185-195, 2003.

LAM, S. K.; NG, T. B. Isolation of a novel thermolabile heterodimeric ribonuclease with antifungal and antiproliferative activities from roots of the sanchi ginseng Panax notoginseng. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, n. 2, p. 419-423, 2001.

LASKOWSKI, Roman A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of applied crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.

MARKOVIĆ-HOUSLEY, Zora et al. Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. **Journal of molecular biology**, v. 325, n. 1, p. 123-133, 2003.

MENEZES, Sara Pereira et al. Evaluation of the allergenicity potential of TcPR-10 protein from Theobroma cacao. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e37969, 2012.

MROCZEK, Seweryn; KUFEL, Joanna. Apoptotic signals induce specific degradation of ribosomal RNA in yeast. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 9, p. 2874-2888, 2008.

OBERMANN, Wolfgang MJ et al. In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. **The Journal of cell biology**, v. 143, n. 4, p. 901-910, 1998.

PARK, Chang-Jin; SEO, Young-Su. Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones for plant immunity. **The plant pathology journal**, v. 31, n. 4, p. 323, 2015.

PAUMI, Christian M. et al. ABC transporters in Saccharomyces cerevisiae and their interactors: new technology advances the biology of the ABCC (MRP)

subfamily. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 4, p. 577-593, 2009.

PRODROMOU, Chrisostomos et al. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. **Cell**, v. 90, n. 1, p. 65-75, 1997.

PUNGARTNIK, Cristina et al. High-affinity copper transport and Snq2 export permease of *Saccharomyces cerevisiae* modulate cytotoxicity of PR-10 from *Theobroma cacao*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 22, n. 1, p. 39-51, 2009.

ROGERS, Bruce et al. The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 207-214, 2001.

SABNIS, Neha G. et al. The Efflux Transporter ABCG2 Maintains Prostate Stem Cells. **Molecular Cancer Research**, v. 15, n. 2, p. 128-140, 2017.

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

SELS, Jan et al. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 941-950, 2008.

SILVA, F. A. C. et al. Proteomic response of *Moniliophthora perniciosa* exposed to pathogenesis-related protein-10 from *Theobroma cacao*. **Genet Mol Res**, v. 12, p. 4855-4868, 2013.

SILVA, F.A.C. TcPR-10: Mecanismo de transporte e ação em fungos. **Tese de doutorado**. 2013.

SOMSSICH, Imre E. et al. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 8, p. 2427-2430, 1986.

TELBISZ, Ágnes et al. Regulation of the function of the human ABCG2 multidrug transporter by cholesterol and bile acids: effects of mutations in potential substrate and steroid binding sites. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 42, n. 4, p. 575-585, 2014.

VAN LOON, L. C. et al. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, n. 3, p. 245-264, 1994.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 55, n. 2, p. 85-97, 1999.

VAN LOON, Leendert C.; REP, Martijn; PIETERSE, Corné MJ. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 44, p. 135-162, 2006.

WILCOX, Lisa J. et al. Transcriptional profiling identifies two members of the ATP-binding cassette transporter superfamily required for sterol uptake in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 36, p. 32466-32472, 2002.

WOLFGER, Hubert; MAMNUN, Yasmine M.; KUCHLER, Karl. Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. **Research in microbiology**, v. 152, n. 3-4, p. 375-389, 2001.

ZDOBNOV, Evgeni M.; APWEILER, Rolf. InterProScan—an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. **Bioinformatics**, v. 17, n. 9, p. 847-848, 2001.

ZHOU, Xiang-Jun et al. A cotton cDNA (GaPR-10) encoding a pathogenesis-related 10 protein with in vitro ribonuclease activity. **Plant Science**, v. 162, n. 4, p. 629-636, 2002.

4. CAPÍTULO 2

Transformação genética de planta modelo com gene *TcPR-10mut* endereçado ao apoplasto

Natasha dos Santos Lopes, Sara Pereira Menezes, Márcio Gilberto Cardoso Costa, Fabienne Micheli

Contribuição dos autores:

NSL, SPM e FM foram responsáveis pela concepção e design das experiências, análise dos dados e redação do manuscrito; NSL foi responsável pela execução de todas as experiências; MGCC auxiliou nas etapas de cultura de tecidos e cedeu a estrutura de laboratório de cultura de tecidos; FM cedeu a infraestrutura de laboratório de biologia molecular, foi responsável pelo apoio financeiro da pesquisa e pelo aconselhamento de NSL.

Artigo em preparação.

Transformação genética de planta modelo com gene *TcPR-10mut* endereçado ao apoplasto

Natasha dos Santos Lopes¹, Sara Pereira Menezes¹, Márcio Gilberto Cardoso Costa¹, Fabienne Micheli^{1,2}

¹ Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Centro de Biotecnologia e Genética (CBG), Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, 45662-900 Ilhéus-BA, Brazil.

² CIRAD, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France.

* Autor correspondente: 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

Abreviaturas: PR: proteína relacionada a patogênese

Palavras-chave: peptídeo sinal; vassoura-de-bruxa

RESUMO

O gene TcPR-10 codifica uma proteína relacionada à patogênese com atividade de ribonuclease e antifúngica. Essa proteína foi identificada em uma biblioteca de cDNA sendo diferencialmente expressa na interação cacau (variedade suscetível) com o fungo *Moniliophthora perniciosa*. A TcPR-10 é uma proteína citoplasmática, atuando principalmente das fases finais da vassoura-de-bruxa. Testes *in vitro* demonstraram sua ação antifúngica em micélio dicariótico, monocariótico e em basidiósporos. Contudo, a TcPR-10 possui domínios conservados com proteínas do grão de pólen, que confere potencial de alergenicidade a essa proteína. Assim, foram realizadas mutações em alguns aminoácidos próximos a esse domínio que diminuíram seu potencial alergênico sem influenciar nas suas atividades de ribonuclease e antifúngica. Desse modo, fusionamos a TcPR-10 mutante (TcPR-10mut) com uma sequência sinal de endereçamento ao espaço extracelular da TcPR-4. Essa construção sob o controle do promotor constitutivo CamV35S foi clonado em vetor pCAMBIA 2301, posteriormente utilizado em transformação genética de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom). Essa estratégia visa o endereçamento da TcPR-10mut ao apoplasto para que essa proteína possa atuar no combate ao fungo *M. perniciosa* nos estágios iniciais da doença vassoura-de-bruxa.

INTRODUÇÃO

O *Theobroma cacao* é uma espécie economicamente importante, suas amêndoas são a principal fonte de matéria prima para a produção do chocolate e de outros subprodutos (ALMEIDA; VALLE, 2008; SILVA NETO, 2001). Na década de 80 o Brasil representava cerca de 20% da produção mundial de cacau, sendo que o Sul da Bahia era responsável por 95% desse valor (ALVIM; NAIR, 1986). Mais tarde, com o advento da vassoura-de-bruxa, doença do cacaueiro causada pelo fungo basidiomicota hemibiotrófico *Moniliophthora perniciosa*, houve grande devastação dessa cultura, gerando perdas significativas nas plantações de cacau, além de impactos sociais e econômicos (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005; PEREIRA et al., 1989).

Por se tratar de um fungo hemibiotrófico, *M. perniciosa* apresenta duas fases distintas em seu ciclo de vida: a fase biotrófica e a fase necrotrófica. A fase biotrófica é caracterizada pela formação do micélio monocariótico e colonização do espaço extracelular (apoplasto) da célula vegetal de onde obtém os nutrientes necessários para se nutrir e se desenvolver. Com o avanço da interação, o fungo começa a formar grampos de conexão entre as células das hifas, desenvolvendo o micélio dicariótico que passa a crescer intracelularmente no tecido da planta (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005; SCARPARI et al., 2005; SENA; ALEMANNO; GRAMACHO, 2014). Estudos envolvendo a interação cacau-*M. perniciosa* vem sendo realizados na tentativa de compreender os processos moleculares relacionados a biologia dessa doença e realizar o seu controle. Assim, foram identificados genes envolvidos na resposta de defesa da planta contra o fungo, que podem ser utilizados em futuras análises de caracterização e possivelmente gerar métodos de combater a doença (DA HORA JUNIOR et al., 2012; GESTEIRA et al., 2007; MICHELI et al., 2010).

O gene *TcPR-10* foi identificado sendo diferencialmente expresso em uma biblioteca de cDNAs da interação cacau-*M. perniciosa* (GESTEIRA et al., 2007). Posteriormente foi visto com expressão 40 vezes aumentada em relação ao tratamento controle em plantas, após 60 dias da infecção com *M. perniciosa* (DA HORA JÚNIOR et al., 2012). Nessa fase está ocorrendo o início da necrose no tecido da planta (MEINHARDT et al., 2008). A proteína originada desse gene é

citoplasmática e possui atividade de RNase e antifúngica em micélio monocariótico, dicariótico e basíósporos (PUNGARTNIK et al., 2009). Contudo, apresenta domínios conservados com proteínas do grão de pólen, como a Bet v1, proteína de alto potencial alergênico (GAJHEDE et al., 1996; MARKOVIC-HOUSLEY et al., 2003; MENEZES et al., 2012). Afim de diminuir as características de alergenicidade dessa proteína, foram feitas mutações próximas a esse domínio, diminuindo seu potencial alergênico sem interferir nas suas funções de ribonuclease e antifúngica (MENEZES et al., 2012).

Assim, TcPR-10 mutante (TcPR-10mut) torna-se um alvo com alto potencial biotecnológico para ser explorado em transformação genética de plantas, por meio da engenharia genética, visando caracterização da atuação dessa proteína na resistência ao fungo causador da vassoura-de-bruxa e outros patógenos, bem como para aumentar a resistência da planta a estresses abióticos. Vários trabalhos envolvendo transformação genética de plantas com proteínas PR, geraram organismos mais resistentes a estresses bióticos e abióticos (ALEXANDER et al., 1993; JABER et al., 2017; WANG et al., 2011). O tomate (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) é utilizado como organismo modelo para estudos do patossistema cacau-*M. perniciosa*, pois tem bom crescimento, ciclo de vida curto e tem frequência de até 80% em transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (MEISSNER et al., 1997). Sendo um importante modelo para estudo da interação cacau-*M. perniciosa* do biótipo S (MARELLI et al., 2009). Assim, visto que a TcPR-10 tem potencial antifúngico e é uma proteína citosólica, é desejado que ela seja direcionada para o apoplasto da planta, para servir de barreira primária contra patógenos como *M. perniciosa*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Análise comparativa

A sequência de aminoácidos da TcPR-10mut foi submetida a um BLAST nos bancos de dados *Sol genomics Network* e *Cocoa genome Hub*, a fim de encontrar sequências de proteínas homólogas no cacau e tomate. As sequências encontradas

foram submetidas ao *Conserved Domains* do NCBI para filtrar apenas proteínas que possuem o domínio conservado da TcPR-10. O programa *Archeopteryx*, foi utilizado para gerar um dendograma dessas sequências com parâmetros *default* e *bootstrap* de 100.

2. Desenho de *primers* e adição de peptídeo sinal ao gene *TcPR-10* mutante

As sequências dos genes *TcPR-10* e *TcPR-4* de *Theobroma cacao* foram obtidas no banco de dados do genoma de cacau (*Cocoa Genome Hub*) e submetidas a análise de sequência sinal com base no *SignalP 4.1 Server* (PETERSEN et al., 2011). Dois pares de *primers* foram desenhados manualmente para amplificação do gene *TcPR-10* mutante (*TcPR-10mut*), sequência sinal do *TcPR-4* e posterior junção do produto dessas duas amplificações. A sequência nucleotídica de endereçamento do produto proteico para o espaço extracelular foi inserida no gene *TcPR-10mut* por meio da técnica de sobreposição de fragmentos da reação em cadeia da DNA polimerase (*overlap extension Polymerase Chain Reaction*). A técnica de *overlap extension PCR* se baseia no desenvolvimento de iniciadores específicos para a região de interesse a ser mutada gerando fragmentos que se sobrepõe (HO ET AL., 1989). A primeira reação utilizou os *primers* F: PR10PS *Apal* (5'GGCGGGCCCATGAAAATGGAGAGATTC 3') contendo uma sequência adaptadora e R: PRPS (5'GTGACACCCATGGCAGCAGCAGAAGC 3'), para amplificação do peptídeo sinal do gene *TcPR-4*; Na segunda reação foram utilizados os *primers* R: PR10 *SacI* R (5'GGCGAGCTCTTAAGCGTAGACATTGG 3') contendo uma sequência adaptadora e F: PR4-PR10 (5'TCTGCTGCTGCCATGGGTGTCACCACATATACG 3'), para amplificação do gene *TcPR-10mut*. Os iniciadores PR10 *SacI* (R) e PR10PS *Apal* (F) foram submetidos a uma terceira reação de PCR para unir os fragmentos obtidos nas reações anteriores contendo extremidades sobrepostas que se anelaram. O DNA molde utilizado nas reações foi obtido a partir de estoque glicerol de *E.coli* TOP 10 transformadas com os vetores pet28a e pGEM-T, contendo as sequências de ambos os genes.

3. Construção de vetores contendo *PS:TcPR-10mut*

O produto de PCR referente a sequência *PS:TcPR-10mut*, foi purificado usando o kit de purificação PureLink™ Quick Gel Extraction Kit de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen) e clonado no vetor PUC118 sob o controle do promotor e terminador do vírus do mosaico do Couve-flor 35S (CAMV35S). O produto da ligação foi utilizado para transformar células TOP10 de *Escherichia coli* por choque térmico. As colônias transformadas, foram confirmadas por PCR e digestão utilizando a enzima *Pst*I.

4. Montagem e síntese das construções pCAMBIA2301:PS:TcPR-10mut e pCAMBIA2301:PS:TcPR-10mut:GFP para transformação de plantas

Sequências promotora e terminadora do vírus do mosaico do Couve-flor 35S (CAMV35S) foram obtidas por meio do mapa do vetor pSAT1A-cEYFP-N1, arquivo disponibilizado pela FastBio. A sequência da proteína de fluorescência GFP (*Aequoria victoria green fluorescent protein*) foi retirada do *SnapGene Software for everyday molecular biology*. Ambas sequências foram submetidas a análise no NCBI utilizando a ferramenta Nucleotide BLAST. A montagem da construção contendo GFP foi realizada utilizando o protocolo *Design and Use of Fluorescent Fusion Proteins in Cell Biology* (SANAPP, 2005). A predição da influência de GFP na conformação da TcPR-10mut foi realizada utilizando o I-TASSER *server for protein structure and function prediction*. Para as duas construções foi solicitada a otimização de códons para o sistema modelo Tomateiro Micro-Tom (*Solanum Lycopersicum*). Os clones foram sintetizados pela empresa *FastBio*.

5. Transformação genética de Tomateiro var. 'Micro-Tom'

Agrobacterium tumefaciens (EHA 105) contendo as construções pCAMBIA2301:PS:TcPR-10mut, pCAMBIA2301:PS:TcPR-10mut:GFP e o vetor pCAMBIA 2301 vazio foram cultivadas em meio YEP (Tabela 1) contendo 50 mg L⁻¹ de rifampicina e 50 mg L⁻¹ de canamicina, durante 24 horas a 220 rpm e 28°C. A cultura de *A. tumefaciens* foi centrifugada a 3500 rpm durante 10 min a 4°C e ressuspendida em meio MS líquido (MURASHIGE E SKOOG, 1962) contendo 3% (w/v) de sacarose e 10 mM de acetossiringona a pH 5,8. A cultura de *A. tumefaciens* foi ajustada para OD600 = 0,3-0,4 (uma OD 600 corresponde a 10⁸ células/ml de

cultura). Os explantes do hipocótilo de tomate foram incubados com a suspensão bacteriana, à temperatura ambiente durante 10 minutos, sob agitação suave. Após a incubação, os explantes foram transferidos para placas de Petri contendo papel filtro esterilizado para remover o excesso de *A. tumefaciens*. Os explantes foram colocados com o lado adaxial para baixo em placas de Petri contendo meio de CO (Tabela 1) e mantidos no escuro a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 2 dias. Após este período, os explantes foram transferidos para o meio de RE (Tabela 1) contendo 2 mg.L⁻¹ de higromicina como agente de seleção e mantidos sob um fotoperíodo de 10 h a $23 \pm 1^\circ\text{C}$; o lado abaxial dos explantes foi colocado em contato com o meio de cultura. Os explantes regenerados foram subcultivados em meio de EL (Tabela 1) para alongamento.

Tabela 1. Composição dos diferentes meios utilizados nesse estudo

Nome	Composição	Função
GE	½ sais MS, NN vitaminas, sacarose 3% (w/v), mio-inositol 100 mg.l-1, pH 5.8, agar 0.7% (w/v)	Germinação das sementes
CO	Sais MS, NN vitaminas, sacarose 3% (w/v), mio-inositol 100 mg.l-1, 2,4-D 0.2 mg.l-1, acetoseringona 10 mM, pH 5.8, 0.7% agar (w/v)	Aumento da eficiência de transformação com <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
RE	Sais MS, NN vitaminas, sacarose 3% (w/v), mio-inositol 100 mg.l-1, 2,4-D 0.2 mg.l-1, acetoseringona 10 mM, pH 5.8, 0.7% agar (w/v)	Indução de formação de brotos com o desenvolvimento da parte aérea
EL	Sais MS, NN vitaminas, sacarose 3% (w/v), mio-inositol 100 mg.l-1, zeatina 0.5 mg.l-1, Timentin 300 mg.L-1, pH 5.8, 0.7 % agar (w/v)	Alongamento de brotos
YEP	2% peptona, 2% extrato de levedura, 2% NaCl, pH 7.0	Crescimento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise comparativa de proteínas PR-10 de cacau e tomate

O dendograma foi gerado apenas com proteínas PR-10 de cacau e tomate que apresentaram o domínio Betv1 conservado (Figura 1). A família 10 das proteínas relacionadas a patogênese possuem uma região altamente conservada denominada motivo P-loop. Trata-se de uma região rica em glicina, relacionada ao potencial alergênico de proteínas de grão de pólen e atividade de ribonuclease de alguns membros dessa família (MENEZES et al., 2012; MIRZA et al., 2000; SPANGFORT et al., 2003). Foi possível classificar três grupos com base em suas semelhanças. O primeiro grupo (1) se caracteriza pela presença apenas de proteínas de cacau com sequências mais heterogêneas. Nesse grupo estão presentes: PYL6 e 4 receptoras do ácido abscísico; Norcoclaurinas sintase (NCS) incluindo uma com presença de peptídeo sinal; e proteínas MLP-like. Apesar de termos encontrado uma norcoclaurina sintase com sequência sinal, indicando uma exportação dessa proteína, sua principal função é participação na síntese de alcaloides, sem função de atividade de RNase descrita (LEE; FACCHINI, 2010). O segundo grupo (2) incluiu em sua maioria, proteínas PR-10 de tomate. Esse foi o grupo com que a TcPR-10mut apresentou maior similaridade. Apesar da similaridade da proteína mutante ser com PR-10 citoplasmáticas de tomate, o nosso modelo de transformação genética, o endereçamento de TcPR-10mut poderá ser o diferencial dessa proximidade. No segundo (2) e terceiro (3) grupos foi predominante a presença de proteínas com alto potencial de alergenicidade (*Pru ar 1*, *Pru av 1*, *Major allergen d 1*) (Figura 1).

Figura 1: Dendograma gerado pelo *Archeopteryx*, representando comparativamente proteínas PR-10 de tomate e cacau. 1. Marcado em amarelo está representado o primeiro grupo, caracterizado por possuir maior heterogeneidade entre as sequências. **2.** Representado na cor preta está o segundo grupo, com PR-10 de tomate em sua maioria, onde foi agrupada a TcPR-10mut. **3.** Representado na cor azul está o terceiro grupo, onde foi predominante a presença de proteínas com alto potencial de alergenicidade.

Identificação do peptídeo sinal

A sequência do gene *TcPR-4* foi submetida ao programa *SignalP* 4.1 permitindo prever o início e término da sequência sinal, pela presença, no gráfico, de um pico de cor verde na posição 20 da sequência da proteína, que ultrapassa o *threshold* de 0.450 (Material suplementar 1). Essa sequência indica um sinal secretor da proteína para o endereçamento e translocação da proteína através do compartimento subcelular (HEIJNE, 1990).

Desenho dos primers

O *primers* desenhados, contendo sequências adaptadoras (Tabela 2) foram baseados no esquema desenvolvido com as sequências dos genes que codificam a proteína TcPR-10mut e o peptídeo sinal da TcPR-4 (Figura 2).

ATGAAAATGGAGAGATTCTGCATTCTGTTGTTAGCTTGTCTGGTGGCTTCTGCTGCTGCCAtgggtgtca
ccacatatagcaagagttcacctgctcagttgccccagccaggatgttcaaggccttgatccttgattc
cgacaaccttatccccaagctcatgcctaaatccatcaagaacgtggagttgattcatggagatggcggt
gttggagcatcaagcaaaccaacttccctgaaggaagtcacttcaagtatttgaagaatagaaccgatg
cccttgatgtagacaactgtgtctgcaagtataactacaattgaggggtgatgtaattggtgacaagcttga
atcaatctcgtacgagttgaagttcgaggcctcaggcgcaggatgcggttgcaagatgactagccactac
cacactaaaggtgactttgttctcaaggaagaggaaatcaaggctggcaaagaccaggccgctcggaatgt
acaaagtcgtggaggaatacctcttggccaatcccaatgtctacgcttaa

Figura 2: Esquema do gene *TcPR-10mut* com o peptídeo sinal do gene *TcPR-4*. Em vermelho a sequência do peptídeo sinal e em preto a sequência genica do *TcPR-10mut*.

Tabela 2. *Primers* específicos para reação de *overlap extension Polymerase Chain Reaction*. Em vermelho *primers* contendo mutações.

Primers	Sequência
PR4-PR10 F	5'TCTGCTGCTGCCATGGGTGTCACCACATATACG 3'
PR-PS R	5'GTGACACCCATGGCAGCAGCAGAAGC 3'
PR10PS <i>Apal</i> F	5'GGCGGGCCCATGAAAATGGAGAGATTC 3'
PR10 <i>SacI</i> R	5'GGCGAGCTCTTAAGCGTAGACATTGG 3'

Amplificação no gene *TcPR-10mut* e peptídeo sinal por *overlap extension Polymerase Chain Reaction*

Utilizando a técnica de sobreposição de fragmentos da reação em cadeia da polimerase (*overlap extension Polymerase Chain Reaction*) a sequência do peptídeo sinal do gene *TcPR-4* foi inserida no gene *TcPR-10* mutante. Na primeira reação de PCR foram utilizados os iniciadores PR10 *SacI* (R) contendo adaptadores, e o PR4-PR10 (F). Dessa reação foi amplificado um fragmento de 480 pb, referente ao tamanho do gene *TcPR10mut* (Figura 3A). Na segunda reação foram utilizados os *primers* PR-PS (R) e PR10PS *Apal* (F) contendo adaptadores, amplificando uma banda de 60 pb referente a sequência do peptídeo sinal do gene *TcPR-4* (Figura 3B). A terceira reação juntou o produto das reações anteriores, utilizando os iniciadores PR10 *SacI* (R) e PR10PS *Apal* (F) (Figura 4).

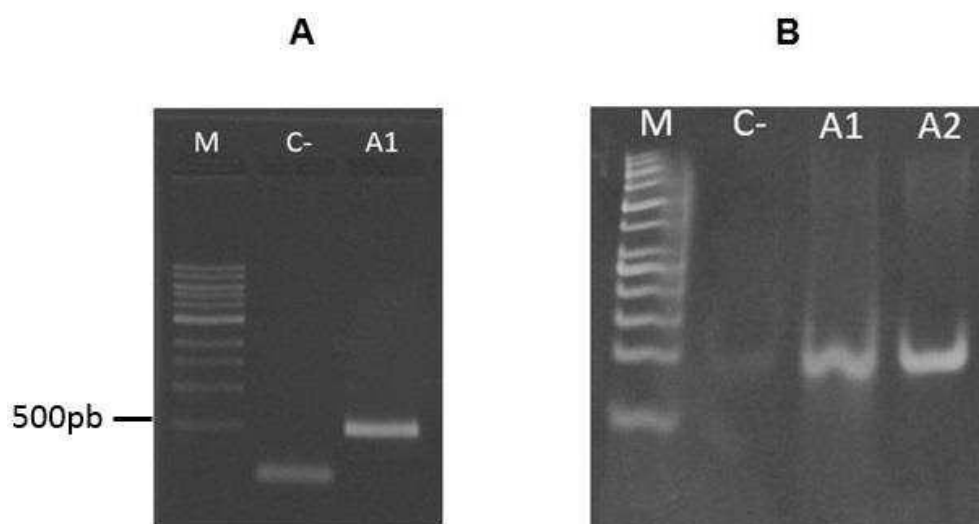


Figura 3: A. Eletroforese em gel de agarose com o produto de PCR utilizando primers PR10 SacI (R) e PR4-PR10 (F). M: marcador de 1Kb. C-: controle negativo. A1: amplificação do gene *TcPR-10mut*, amplificando um fragmento de 480 pb. B. Eletroforese em gel de poliacrilamida com o produto de PCR utilizando primers PR-PS (R) e PR10PS *Apal* (F). M: marcador de 50 bp. C-: controle negativo. A1: amplificação do peptídeo sinal do gene *TcPR-4*, apresentando um fragmento de 60pb. A2: peptídeo sinal purificado.

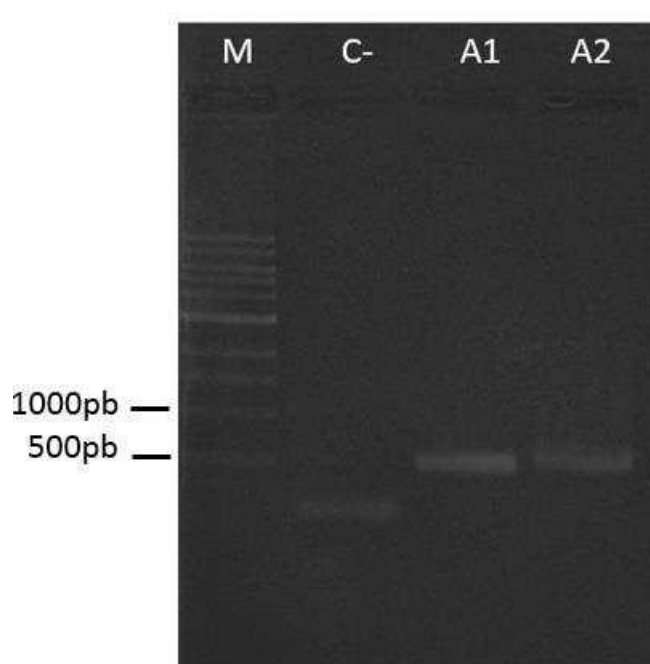


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose com o produto de PCR utilizando primers *SacI* R e PR10PS *Apal* F. M: marcador de 1 Kb. C-: controle negativo. A1: amplificação da construção gene *TcPR-10mut* com o peptídeo sinal da *TcPR-4*, amplificando um fragmento de 540 pb. A2: construção purificada.

Transformação genética de *Escherichia coli* com vetor PUC118/35S contendo *PS:TcPR-10mut*

A construção do gene *TcPR-10mut* com o peptídeo sinal da *TcPR-4* (*PS:TcPR-10mut*) foi clonado no vetor PUC118 sob o controle do promotor 35S, na orientação senso (Figura 5).

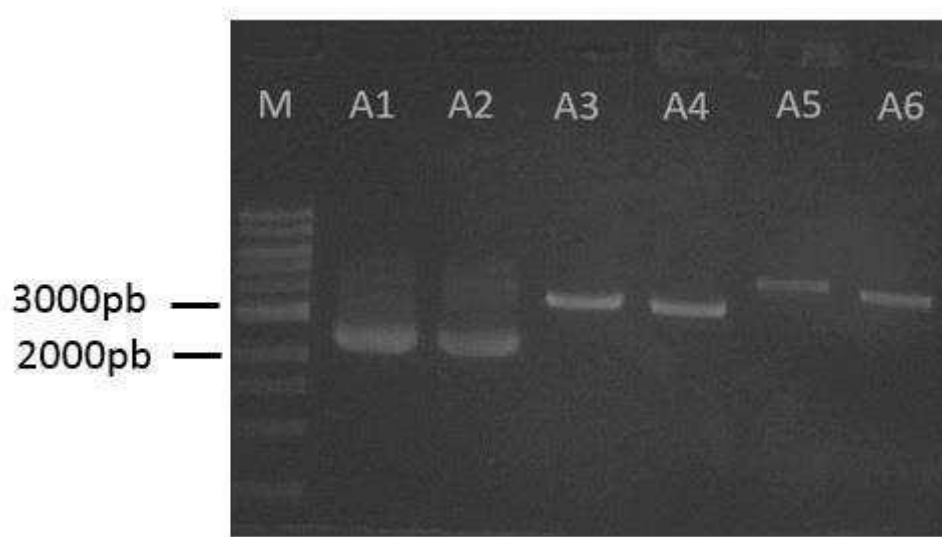


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose. M: marcador de 1 Kb. A1 e A2: PUC118/35S fechado, antes da digestão A3 e A4: PUC118/35S após digestão com enzimas Apal e SacI. A5 e A6: PUC118/35S purificado por precipitação em fenol clorofórmio.

Para confirmação da transformação genética de *E. coli* TOP10 foi realizada uma reação de PCR e uma reação de digestão com a enzima *Pst*I. A reação de PCR mostrou quatro colônias positivas para transformação (Figura 6). A reação de digestão liberou um fragmento do vetor PUC118/35S de aproximadamente 1200 pb correspondente ao cassete contendo promotor 35S, construção *PR10PS* e terminador 35S (Figura 7).

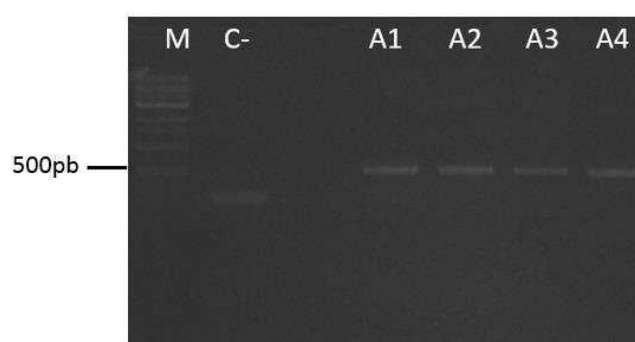


Figura 6: Confirmação das colônias positivas para transformação. Eletroforese em gel de agarose com o produto do PCR de colônia utilizando *primers* SacI R e PR10PS Apal F. M: marcador de 1 Kb. C-: controle negativo. A1, A2, A3 e A4: produto do PCR das colônias individuais amplificando de um fragmento de 540 pb.

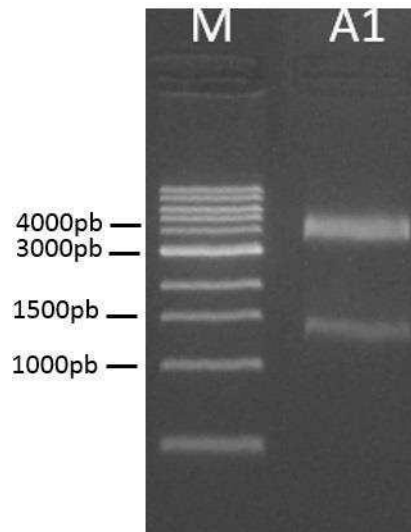


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose da reação de digestão para confirmação da colônia transformada. **M:** marcador de 1 Kb. **A1:** reação de digestão do PUC118/35S que liberou um fragmento de aproximadamente 1200 pb, referente ao cassete contendo promotor, gene *PS:TcPR-10mut* e terminador.

A primeira construção desenhada para síntese pela empresa *FastBio* possui sequência peptídeo sinal de endereçamento ao espaço extracelular, a sequência do gene *TcPR-10mut* e a sequência para a proteína de fluorescência GFP (Figura 8). O fusionamento da proteína GFP permite a visualização da exportação da proteína do espaço citoplasmático para o apoplasto da célula vegetal. A *TcPR-10mut* é uma proteína citoplasmática (PUNGARTINIK et al., 2009). Essa localização permite sua atuação apenas no estágio final da doença vassoura-de-bruxa, fase em que foi verificado níveis mais elevados de sua expressão (DA HORA JUNIOR et al., 2012). A adição do peptídeo sinal a sua sequência e sua expressão constitutiva na célula, poderá possibilitar a ação antifúngica e de ribonuclease da proteína nos estágios iniciais da doença.

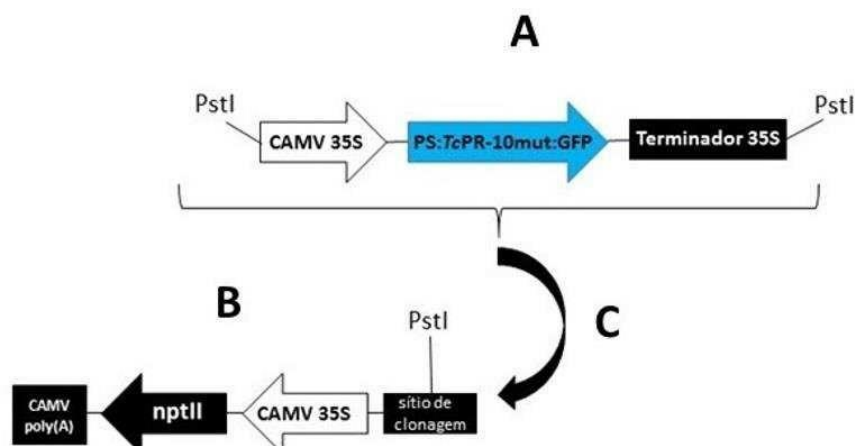


Figura 8: Representação esquemática do plasmídeo pCAMBIA2301 e da construção para validação da exportação da proteína do citoplasma ao espaço extracelular da célula vegetal. **A.** Construção do cassete contendo contendo peptídeo sinal, gene *TcPR-10mut* e GFP sob o controle do promotor constitutivo e terminador CaMV35S. **B.** Gene *nptII* como gene de seleção de resistência à kanamicina, sob controle do promotor CaMV35S, sinal de poliadenilação CAMV e múltiplo sítio de clonagem contendo sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *PstI*. **C.** Seta indicando a fusão do cassete *PS:TcPR-10mut:GFP* com o pCAMBIA 2301.

Para verificar a influência da fusão de GFP sob a conformação da proteína TcPR-10mut foi realizada a modelagem dessa construção, que mostrou mudanças estruturais da TcPR-10mut quando está fusionada com GFP (Figura 9). Essas mudanças podem ocasionar perda de função da TcPR-10mut. Por esse motivo foi desenhada uma segunda construção sem o GFP, contendo apenas peptídeo sinal e o gene *TcPR-10mut* (Figura 10).

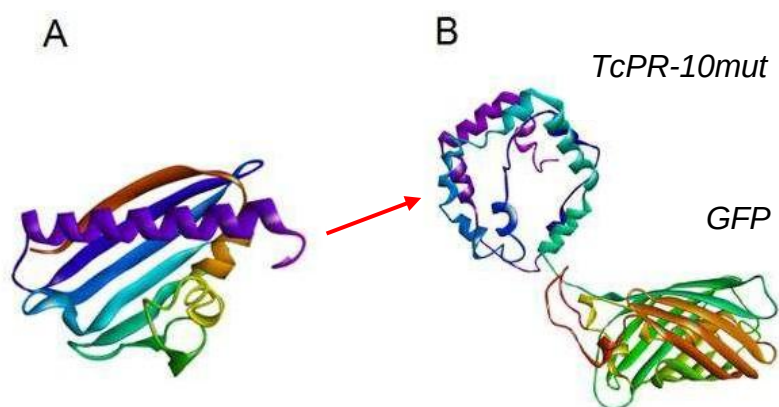


Figura 9: Modelagem da TcPR-10mut e sua fusão com GFP. **A.** modelagem da proteína TcPR-10mut, estruturalmente contendo seis folhas beta, três alfa hélices e alguns motivos P-loop. **B.** Proteínas TcPR-10mut contendo peptídeo sinal fusionada a GFP; seta indica a TcPR-10mut com sua estrutura sendo influenciada pela fusão com GFP.

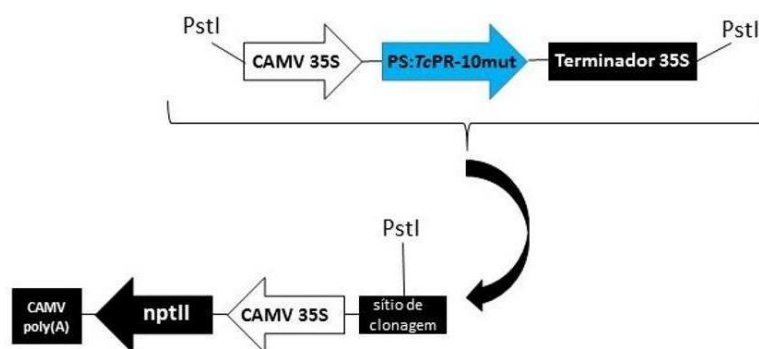


Figura 10: Representação esquemática do plasmídeo pCambia2301 e da construção para exportação da proteína do citoplasma ao espaço extracelular da célula vegetal. A. Construção do cassete contendo contendo peptídeo sinal e gene *TcPR-10mut* sob o controle do promotor constitutivo e terminador CaMV35S. **B.** Gene *nptII* como gene de seleção de resistência à kanamicina, sob controle do promotor CaMV35S, sinal de poliadenilação CAMV e múltiplo sítio de clonagem contendo sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *PstI*. **C.** Seta indicando a fusão do cassete *PS:TcPR-10mut* com o pCambia 2301.

A reação de digestão do vetor pCambia 2301 contendo o gene *PS:TcPR-10mut* empregando-se a enzima de restrição *PstI* gerou dois fragmentos referentes ao vetor pCambia 2301 e o cassete contendo promotor 35S, *PS:TcPR-10mut* e terminador 35S (Figura 11A). A reação de PCR feita com *primers* específicos para amplificação do gene *nptII*, que confere resistência à kanamicina ao vetor pCambia 2301, gerou um fragmento de aproximadamente 800 pb (Figura 11B). Ambos os testes confirmam a síntese do clone contendo a construção *PS:TcPR-10mut*. Plantas de tomate foram transformadas com essa construção e seguem na etapa de regeneração (Figura 12).

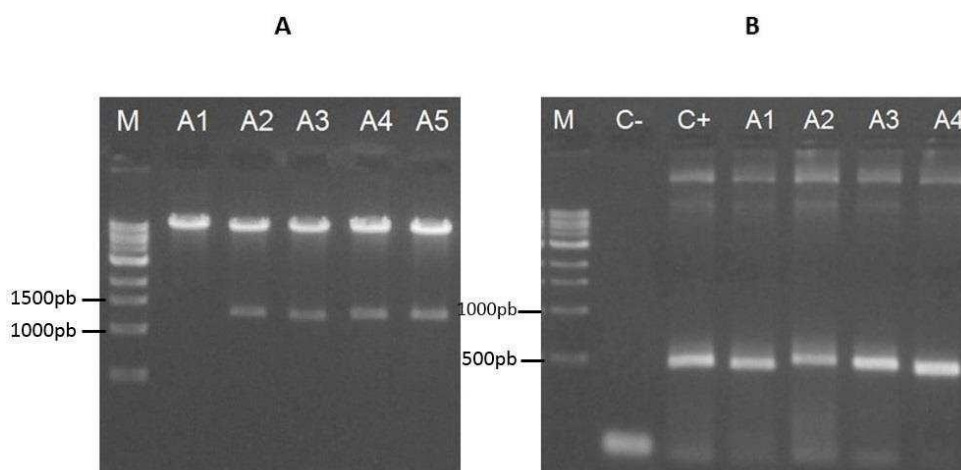


Figura 11: Reação de Digestão e PCR para confirmação de síntese do clone contendo a construção *PS:TcPR-10mut*. A. M: marcador de 1Kb; A1: controle negativo (vetor pCAMBIA 2301 digerido, sem a construção *PS:TcPR-10mut*); A2, A3, A4, A5: digestão do vetor pCAMBIA 2301 contendo a construção *PS:TcPR-10mut*, liberando um fragmento de aproximadamente 1400pb. B. M: marcador de 1Kb; C-: controle negativo (reação de PCR sem DNA); C+: controle positivo (reação de PCR com vetor pCAMBIA 2301 sem a construção *PS:TcPR-10mut*); A1, A2, A3, A4: amplificação de um fragmento de aproximadamente 800pb referente ao gene NptII do vetor pCAMBIA2301 contendo a construção *PS:TcPR-10mut*.



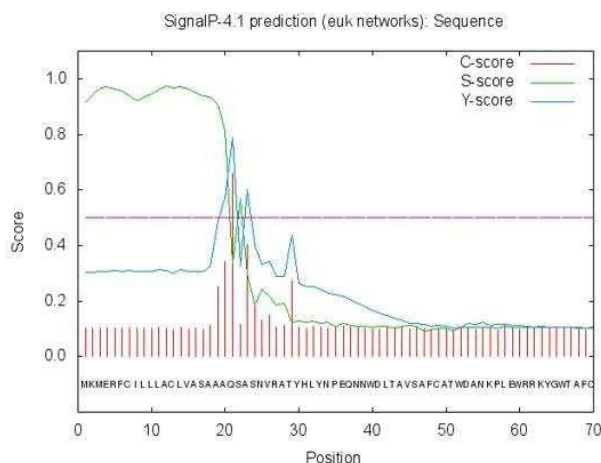
Figura 12: Células de explantes de tomate que passaram pelo evento de transformação, via *Agrobacterium tumefaciens*, com a construção *PS:TcPR-10mut*, em meio de regeneração.

CONCLUSÃO

As células dos explantes transformados com a construção *PS:TcPR-10mut*, seguem em processo de regeneração. A posterior confirmação do evento de transformação, irá possibilitar a obtenção de plantas transgênicas com uma construção contendo um gene de potencial biotecnológico antifúngico e de atividade de RNase (*TcPR-10mut*) endereçado ao apoplasto da célula vegetal. Esse resultado permitirá análises futuras para caracterização da ação dessa proteína nos estágios iniciais da infecção de plantas de tomate com *M. perniciosa*.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Material suplementar 1: Análise da sequência da proteína TcPR-4 pelo programa SignalP 4.1. Na cor vermelha o C-score (pontuação do sítio de clivagem bruta); Na cor verde o S-score (pontuação do peptídeo sinal); Na cor azul o Y-score (pontuação do sítio combinado de clivagem); Na cor lilás o *threshold* com valor do ponto de corte de 0.450.



REFERÊNCIAS

AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, Wilbert. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v. 97, n. 5, p. 1012-1022, 2005.

ALEXANDER, Danny et al. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 15, p. 7327-7331, 1993.

ALMEIDA, Alex-Alan F. de; VALLE, Raúl R. Ecophysiology of the cacao tree. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 4, p. 425-448, 2007.

ALVIM, Ronald; NAIR, P. K. R. Combination of cacao with other plantation crops: an agroforestry system in Southeast Bahia, Brazil. **Agroforestry Systems**, v. 4, n. 1, p. 3-15, 1986.

DA HORA JUNIOR, Braz Tavares 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. 1507-1519, 2012.

- GAJHEDE, Michael et al. X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 3, n. 12, p. 1040, 1996.
- GESTEIRA, Abelmon S. et al. Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora perniciosa*. **Annals of botany**, v. 100, n. 1, p. 129-140, 2007.
- HO, Steffan N. et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. **Gene**, v. 77, n. 1, p. 51-59, 1989.
- JABER, Emad et al. A Gene Encoding Scots Pine Antimicrobial Protein Sp-AMP2 (PR-19) Confers Increased Tolerance against *Botrytis cinerea* in Transgenic Tobacco. **Forests**, v. 9, n. 1, p. 10, 2017.
- KANG, Dong Gyun et al. Versatile signal peptide of *Flavobacterium*-originated organophosphorus hydrolase for efficient periplasmic translocation of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Biotechnology progress**, v. 32, n. 4, p. 848-854, 2016.
- LEE, Eun-Jeong; FACCHINI, Peter. Norcoclaurine synthase is a member of the pathogenesis-related 10/Bet v1 protein family. **The Plant Cell**, v. 22, n. 10, p. 3489-3503, 2010.
- MARELLI, Jean-Philippe et al. Infection biology of *Moniliophthora perniciosa* on *Theobroma cacao* and alternate solanaceous hosts. **Tropical Plant Biology**, v. 2, n. 3-4, p. 149-160, 2009.
- MARKOVIĆ-HOUSLEY, Zora et al. Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. **Journal of molecular biology**, v. 325, n. 1, p. 123-133, 2003.
- MEINHARDT, Lyndel 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.
- MENEZES, Sara Pereira et al. Evaluation of the allergenicity potential of TcPR-10 protein from *Theobroma cacao*. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e37969, 2012.
- MEISSNER, Rafael et al. A new model system for tomato genetics. **The Plant Journal**, v. 12, n. 6, p. 1465-1472, 1997.
- MICHELI, Fabienne et al. Functional genomics of cacao. In: **Advances in botanical research**. Academic Press, 2010. p. 119-177.
- MIRZA, Osman et al. Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 1, p. 331-338, 2000.
- MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- PEČENKOVÁ, Tamara; PLESKOT, Roman; ŽÁRSKÝ, Viktor. Subcellular localization of arabidopsis pathogenesis-related 1 (PR1) protein. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 4, p. 825, 2017.

PEREIRA, J. L. et al. Primeira ocorrencia de vassoura-de-bruxa na principal regio produtora de cacau do Brasil. **Agrotrópica (Brasil)** v. 1 (1) p. 79-81, 1989.

PETERSEN, Thomas Nordahl et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature methods**, v. 8, n. 10, p. 785, 2011.

PUNGARTNIK, Cristina et al. High-affinity copper transport and Snq2 export permease of *Saccharomyces cerevisiae* modulate cytotoxicity of PR-10 from *Theobroma cacao*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 22, n. 1, p. 39-51, 2009.

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*. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 413, p. 865-877, 2005.

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

SILVA NETO, P. J. da. **Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira**. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Belém, PA (Brasil), 2001.

SNAPP, Erik. Design and use of fluorescent fusion proteins in cell biology. **Current protocols in cell biology**, p. 21.4. 1-21.4. 13, 2005.

SPANGFORT, Michael D. et al. Dominating IgE-binding epitope of Bet v 1, the major allergen of birch pollen, characterized by X-ray crystallography and site-directed mutagenesis. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 6, p. 3084-3090, 2003.

VON HEIJNE, Gunnar. The signal peptide. **The Journal of membrane biology**, v. 115, n. 3, p. 195-201, 1990.

WANG, Nili; XIAO, Benze; XIONG, Lizhong. Identification of a cluster of PR4-like genes involved in stress responses in rice. **Journal of plant physiology**, v. 168, n. 18, p. 2212-2224, 2011.

CONCLUSÕES GERAIS

- TcPR-10mut interage com proteínas Heat shock (HSP82 e HslU) e com o transportador de membrana Snq2 da superfamília de transportadores ABC;
- Os dados encontrados no presente estudo permitiram realizar uma predição dos eventos moleculares envolvidos na interação de TcPR-10mut-*M. perniciosus*, desde a sua internalização pela célula fúngica até a sua interação com proteínas relacionadas ao estresse (*Heat Shock*).
- O endereçamento da proteína mutante ao apoplasto possibilita novas perspectivas de estudos relacionados a caracterização da TcPR-10mut na interação com o fungo causador da vassoura-de-bruxa, nos estágios iniciais na doença.