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

Identificação e análise de proteínas associadas à redução do desenvolvimento de *Phytophthora* spp. em citros

LUCAS JHONES DE SANTANA NEVES

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL
Maio de 2023

LUCAS JHONES DE SANTANA NEVES

Identificação e análise de proteínas associadas à redução do desenvolvimento de *Phytophthora* spp. em citros

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: **Genética Molecular e de Micro-organismos**

Orientadora: Drª. Fabienne Florence Lucienne Micheli
Co-orientador: Dr. Raner José Santana Silva

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL
Maio de 2023

LUCAS JHONES DE SANTANA NEVES

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À REDUÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE *Phytophthora* spp. EM CITROS

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

Área de Concentração: **Genética Molecular e de Micro-organismos**

APROVADO: 23 de maio de 2023

Drª. Irma Yuliana Ocampo

Drª. Dayse Drielly Souza Santana Vieira

Drª. Karina Peres Gramacho

Drª. Fabienne Florence Lucienne Micheli
(CIRAD - UESC - Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todas as pessoas que contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desta dissertação.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGGBM) pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) por ter me recebi através da Drª. Karina Peres Gramacho e a Professora Cenilda nos ensinamentos sobre crescimento em meios de cultura.

Ao Centro de cooperação internacional em pesquisa agronômica para o desenvolvimento (Cirad) pala colaboração, através do grupo de pesquisa na UESC coordenado pela Dra. Fabienne Florence Lucienne Micheli

Á minha orientadora, Prof. Dra. Fabienne Florence Lucienne Micheli, meu coorientador Prof. Dr. Raner José Santana Silva e meu colaborador Prof. Dr. Edson Mario de Andrade pelo seu apoio, e orientações valiosas ao longo de todo o processo de pesquisa. Suas experiências e dedicação foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

Agradeço aos membros da banca examinadora, pela disposição em avaliar este trabalho e por seus valiosos comentários e sugestões durante a defesa. Seus insights e críticas construtivas contribuíram significativamente para o aprimoramento desta dissertação.

Sou grato aos meus colegas de classe, pelo suporte e colaboração ao longo desta jornada de pesquisa. Suas discussões e ideias foram enriquecedoras e estimulantes, e contribuíram para o desenvolvimento das minhas próprias ideias.

Gostaria de estender meus agradecimentos a Mara e Fabrícia da secretaria do programa, pela sua assistência na obtenção de documentos e demandas, destreza e eficiência em lidar com todas as questões administrativas relacionadas ao curso e na velocidade em resolução de problemas.

Gostaria de agradecer a Thais Arrais Mota minha companheira durante toda minha jornada da minha dissertação, agradeço pela presença constante, pelo apoio incondicional e pela

compreensão durante os momentos desafiadores e intensos deste processo. Sua paciência, encorajamento e amor foram fundamentais para minha motivação e equilíbrio emocional ao longo dessa caminhada acadêmica.

Agradeço aos meus pais por serem meu principal suporte, sempre disponíveis para resolver qualquer problema que pudesse atrapalhar o término do mestrado e o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos meus familiares e amigos pelo apoio ao longo deste processo acadêmico. Seu encorajamento, compreensão e incentivo foram essenciais para minha motivação e perseverança.

A todos os mencionados acima e a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho, expresso meu profundo agradecimento. Seu apoio foi de extrema importância e sou grato pela oportunidade de trabalhar e aprender com vocês.

Lucas Jhones de Santana Neves

RESUMO

NEVES, Lucas Jhones de Santana, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, maio de 2023. Identificação e análise de proteínas associadas à redução do desenvolvimento de *Phytophthora* spp. em citros. Orientadora: Dra. Fabienne Florence Lucienne Micheli. Co-orientador: Dr. Raner José Santana Silva.

Proteger as plantas das espécies de *Phytophthora spp.* tem sido um dos maiores desafios da citricultura, uma vez que, este oomiceto é responsável por causar uma das infecções mais importantes dos citros, a 'Gomose da *Phytophthora*', causando perda da qualidade dos frutos, reduzindo a produção e resultando em prejuízo econômico. Deste modo, identificar marcadores moleculares para seleção de variedades resistentes e também identificar novos alvos para o desenvolvimento de pesticidas mais eficazes e específicos, contribuindo deste modo para o entendimento do funcionamento das vias metabólicas que conferem resistência ao fitopatógeno. O presente estudo está dividido em dois capítulos: O capítulo 1 aborda a identificação e analisar moléculas (genes/proteínas) associados à redução do desenvolvimento de *Phytophthora* spp. em citros em variedades suscetíveis e resistentes a *Phytophthora* spp, a partir de dados proteômicos, através de redes de interação proteína – proteína, identificando clusters de proteínas e analisando com quais funções biológicas esses clusters estão associados. O capítulo 2 apresenta tentativas de modelagem tridimensionais de proteases de *Phytophthora spp.* e inibidores de proteases de citros a partir de ortólogos de *Theobroma cacao.* Os dados produzidos nesta pesquisa contribuem para melhor entendimento de funcionamento da defesa do gênero citrus contra o fitopatógeno *Phytophthora* spp.

Palavras-chave: Citricultura; Interação planta-patógeno; Proteômica

ABSTRACT

NEVES, Lucas Jhones de Santana, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, may, 2023. Identification and analysis of proteins associated with reduced development of *Phytophthora* spp. in citrus. Advisor: Fabienne Florence Lucienne Micheli.

Protect plants from *Phytophthora* spp. has been one of the biggest challenges in citrus growing, since this oomycete is responsible for causing one of the most important infections of citrus, '*Phytophthora* gummosis', causing loss of fruit quality, reducing production and resulting in economic loss. In this way, to identify molecular markers for the selection of resistant varieties and also to identify new targets for the development of more effective and specific pesticides, thus contributing to the understanding of the functioning of the metabolic pathways that confer resistance to the phytopathogen. The present study is divided into two chapters: Chapter 1 addresses the identification and analysis of molecules (genes/proteins) associated with reduced development of *Phytophthora* spp. in citrus in varieties susceptible and resistant to Phytophthora spp, from proteomic data, through protein-protein interaction networks, identifying protein clusters and analyzing which biological functions these clusters are associated with. Chapter 2 presents attempts at three-dimensional modeling of proteases from *Phytophthora* spp. and citrus protease inhibitors from *Theobroma cacao* orthologs. The data produced in this research contribute to a better understanding of the functioning of the defense of the genus citrus against the phytopathogen *Phytophthora* spp.

Keywords: Citriculture; Plant-pathogen interaction; Proteomics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cruzamento entre variedades de citros demonstrando sua derivação em novas variedades, com destaque para as quatro espécies ancestrais. Fonte: Curk et al. 2016.....14

Figura 2. Exsudação de goma em limoeiro infectado pelo oomiceto *Phytophthora* sp. Fonte: HidrauTecSP, 2022……...17

Figura 3. Ciclo de vida de *Phytophthora infestans* na batata. Fonte: Wikimedia Commons ..18

CAPÍTULO 1

Figura 1. *Heatmap* do acúmulo de proteínas da variedade de citrus 'Sunki Maravilha' (suscetível) infectada com *Phytophthora* spp, utilizando o valor médio das triplicatas para os grupos controle infectado e ferido.....46

Figura 2. *Heatmap* do acúmulo de proteínas da variedade de citrus 'Citrumelo Swingle' (resistente) infectada com *Phytophthora* spp, utilizando o valor médio das triplicatas para os grupos controle infectado e ferido. 47

Figura 3. Rede de interação proteína-proteína da variedade de citros 'Sunki Maravilha' utilizando proteínas *up* acumuladas e exclusivamente acumuladas após ferimento e/ou infecção por *Phytophthora* spp. Onde: triângulo representa proteínas *bottleneck* (B); quadrado representa proteínas *hub* (H); circunferência representa proteínas comuns (C); hexágono representa proteínas *hub-bottleneck* (HB). 48

Figura 4. Rede de interação proteína-proteína da variedade de citros 'Sunki Maravilha' utilizando proteínas *down* acumuladas após ferimento e/ou infecção por *Phytophthora* spp. Onde: triangulo representa proteínas *bottleneck* (B); quadrado representa proteínas *hub* (H); circunferência representa proteínas comuns (C); hexágono representa proteínas *hub-bottleneck* (HB).....49

Figura 5. Rede de interação proteína-proteína da variedade de citros 'Citrumelo Swingle' utilizando proteínas *up* acumuladas e exclusivamente expressas após ferimento e/ou infecção por *Phytophthora* spp. Onde: triangulo representa proteínas *bottleneck* (B); quadrado representa proteínas *hub* (H); circunferência representa proteínas comuns (C); hexágono representa proteínas *hub-bottleneck* (HB). 50

Figura 6. Rede de interação proteína-proteína da variedade de citros ‘Citrumelo Swingle’ utilizando proteínas *down* acumuladas após ferimento e/ou infecção por *Phytophthora* spp. Onde: triangulo representa proteínas *bottleneck* (B); quadrado representa proteínas *hub* (H); circunferência representa proteínas comuns (C); hexágono representa proteínas *hub-bottleneck* (HB). 51

CAPÍTULO 2

Figura 1. Destaque em vermelho indica a formação de grupos observados através do alinhamento das sequências de inibidores de protease de citros.....69

Figura 2. Alinhamento de sequências de inibidores de protease. Domínio menos conservado destacado em vermelho, domínios mais conservados estão destacados em preto.....70

Figura 3. Tentativa de modelagem de algumas sequências de inibidores de protease de citrus.71

Figura 4. Modelagem protease de *Phytophthora* sp com conformação 3D satisfatória (confidente > 80%) 71

Figura 5. Modelagem protease de *Phytophthora* sp com conformação 3D insatisfatória (very low < 50%). 72

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Proteínas diferencialmente expressas com maior influência na variabilidade entre amostras controle e infectadas da variedade 'Sunki Maravilha'.....39

Tabela 2. Proteínas diferencialmente expressas com maior influência na variabilidade entre amostras controle e infectadas da variedade 'Citrumelo Swingle'.....41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 12

2 REVISÃO DE LITERATURA 14

2.1 Citros 14
2.2 Citricultura no Brasil 15
2.3 *Phytophthora* em citros 16
2.4 Ciclo de vida de *Phytophthora* 17
2.5 Interação planta-patógeno 19
2.6 Inibidores de protease 20
2.7 Abordagem proteômica 21
2.8 Abordagem interatômica 23

REFERÊNCIAS 24

CAPÍTULO 1. Identificação de proteínas e interações envolvidas na resposta de citros a *Phytophthora* spp. através de análises proteômicas e de redes de interação proteína, proteína.....30

RESUMO.....31
ABSTRACT.....32
1. INTRODUÇÃO 33
2. MATERIAL E MÉTODOS 35
3. RESULTADOS 38
4. DISCUSSÃO 51
5. CONCLUSÃO 56

REFERÊNCIAS 57

CAPÍTULO 2. Modelagem de proteínas de inibidores de protease de citros e proteases do oomiceto *Phytophthora* spp.: uma abordagem computacional para compreender a interação planta – patógeno 61

RESUMO.....62
ABSTRACT.....63
1. INTRODUÇÃO 65
2. MATERIAL E MÉTODOS 67
3. RESULTADOS 69
4. DISCUSSÃO 73
5. CONCLUSÃO 75

REFERÊNCIAS 76

CONCLUSÃO GERAL…….....……79

INTRODUÇÃO GERAL

A produção de frutas cítricas é uma das principais culturas mundiais. O Brasil é um dos maiores produtores e também exportadores de citros, com destaque para as laranjas. O suco de laranja é o principal produto brasileiro exportado (CARVALHO et al., 2019), e o Brasil é o maior exportador da bebida, exportando 95% da sua produção nacional (AMARO et al., 2021), o que corresponde a mais de 50% da produção mundial.

Apesar de ser uma grande cultura, diversos fatores vêm interferindo significativamente na produção citrícola no Brasil, tanto fatores abióticos como as variações climáticas, seca e temperaturas elevadas (STUCHI E GIRARDI, 2010), bem como fatores bióticos como pragas e doenças (DALIO et al., 2014). A infecção por microrganismos fitopatogênicos em grandes culturas pode ocasionar grande prejuízo econômico, reduzir a produção e causar a perda da qualidade dos frutos (COSMO e GALERIANI, 2020) (BASTOS et al., 2017), sendo um dos maiores desafios da produção citrícola. Dentre as infecções por fitopatógenos que acometem os citros encontra-se o oomiceto *Phytophthora* sp. (BASTOS et al., 2017).

O gênero *Phytophthora* compreende aproximadamente 100 espécies, em sua maioria fitopatogênicas (KROON et al., 2012), com cerca de 24 espécies ocorrendo no Brasil (SANTOS e SANTOS, 2019). *Phytophthora* é responsável por grandes perdas na produção, tanto no Brasil quanto em outros países, uma vez que este fitopatógeno ocorre em praticamente todas as regiões produtoras de frutas do mundo (ERWIN e RIBEIRO, 1996). Nos citros, o gênero *Phytophthora* é responsável por causar a doença popularmente conhecida como "gomose de *Phytophthora*" (BASTOS et al., 2017). Os sintomas são caracterizados pela podridão no caule e na raiz, levando a sintomas como clorose das folhas, lesões nos troncos, e exsudação de goma por fendas encontradas na casca das árvores, a qual deu o nome a doença (TIMMER e MENGE, 1993; ERWIN e RIBEIRO, 1996; FEICHETNBERGER et al., 2005).

A disseminação da "gomose de *Phytophthora*" no Brasil se deu por volta de 1840 e a doença passou a ser considerada uma das doenças mais importantes para a citricultura e tem como principal agente causador *Phytophthora parasitica* (FEICHETNBERGER et al., 2001). Uma vez que, as estratégias de controle das doenças causadas por *Phytophthora* são muito limitadas (ATTARD et al., 2014), é fundamental a compreensão dos mecanismos de interação da relação planta-patógeno, buscando a identificação das regiões do genoma dos citros responsáveis pela resistência a *Phytophthora.*

A associação de estudos proteômicos com análises interatômicas vem promovendo avanço significativo na área vegetal com culturas economicamente importantes, como banana (MATTOS-MOREIRA et al., 2018), cacau (ANDRADE-SILVA et al., 2020; SANTOS et al., 2020; GOMES et al., 2021) e citros (SANTOS et al., 2020). No que se refere a interação planta-patógeno, estudos proteômicos conseguem evidenciar alterações ocorridas no proteoma vegetal durante o processo de infecção, identificando as proteínas expressas no hospedeiro como mecanismo de defesa ao ataque do patógeno (SANTOS et al., 2020). Já a aplicação de abordagem interatômica possibilita a compreensão do papel biológico de uma determinada proteína, além das interações existentes entre as proteínas, (SALVATO et al., 2010) as quais são representadas em formato de rede PPI (interação proteína-proteína).

Os inibidores de protease também têm sido amplamente utilizados em diversos estudos, com destaque para os inibidores de proteases obtidos a partir de plantas, e tem contribuído significativamente para desenvolvimento do setor médico e agrícola. (DAMINELLI et al., 2010; MOTA et al., 2010; SILVA et al., 2018). Dentre as aplicações dos inibidores de protease na agricultura, tem sido frequentemente investigado seu uso como mecanismo de proteção da planta contra pragas e patógenos, além de microrganismos em culturas economicamente importantes, a exemplo o estudo de Cháves et al. (2020) que utilizou os inibidores (benzamidina e berenil) sobre a atividade proteolítica intestinal de cochonilha-verde (*Coccus viridis)* em café *(Coffea arabica).*

Deste modo, o presente estudo tem como objetivo contribuir para a compreensão da interação planta-patógeno, bem como, os mecanismos de resistência dos citros ao oomiceto *Phytophthora*. A dissertação está dividida em dois capítulos: O capítulo 1 intitulado "Identificação de proteínas e interações envolvidas na resposta de citros a *Phytophthora* sp. através de análises proteômicas e redes de interação proteína-proteína" aborda a análise proteômica aliada a análise interatômica, de plantas resistentes e suscetíveis infectadas (ou não) com *Phytophthora parasitica,* representadas por redes de interação proteína-proteína *(PPI).* O capítulo 2 tem como título: "Modelagem de proteínas de inibidores de proteases de citros e proteases do oomiceto *Phytophthora* sp.: uma abordagem computacional para compreender a interação planta-patógeno", apresenta um estudo de biologia estrutural, utilizando a modelagem tridimensional de proteases de *Phytophthora* sp. e de inibidores de proteases de citros, a partir de ortólogos de inibidores de protease de *Theobroma cacao*.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Citros

As plantas do gênero *Citrus* pertencem à família botânica *Rutaceae*, e são nativas da Ásia (do norte da China à Índia) e da Oceania (Queensland, Austrália) (LURO et al., 2017; WU et al., 2018). Para este gênero, existem dois esquemas de classificação, a classificação Tanaka, que compreende 156 espécies, e a classificação Swingle, com apenas 16 espécies. Esses dois sistemas de classificação frequentemente entram em conflito devido ao fato de que as espécies cítricas geralmente são sexualmente compatíveis e que elas estão sujeitas à apomixia (causada por poliembrionia nucelar), a qual resulta na formação de sementes sem fecundação e, portanto, idênticas às da planta mãe. Logo, é comum muitos taxonomistas identificarem híbridos interespecíficos como uma espécie nova (LURO et al., 2017).

Atualmente, acredita-se que híbridos cultivados descendem de quatro táxons ancestrais: *C. medica* L. (cidra), *C. reticulata* Blanco (tangerina), *C. maxima* (Burm.) Merr. (toranja) e *C. Micrantha* Wester (papeda) (CASPERMEYER, 2015; CURK et al., 2014). O subgênero Papeda foi o último táxon a ser reconhecido como espécie fundamental, sendo *C. micrantha* a quarta espécie, o que teria levado à origem dos limões (BARKLEY et al., 2006; CURK et al. 2016).

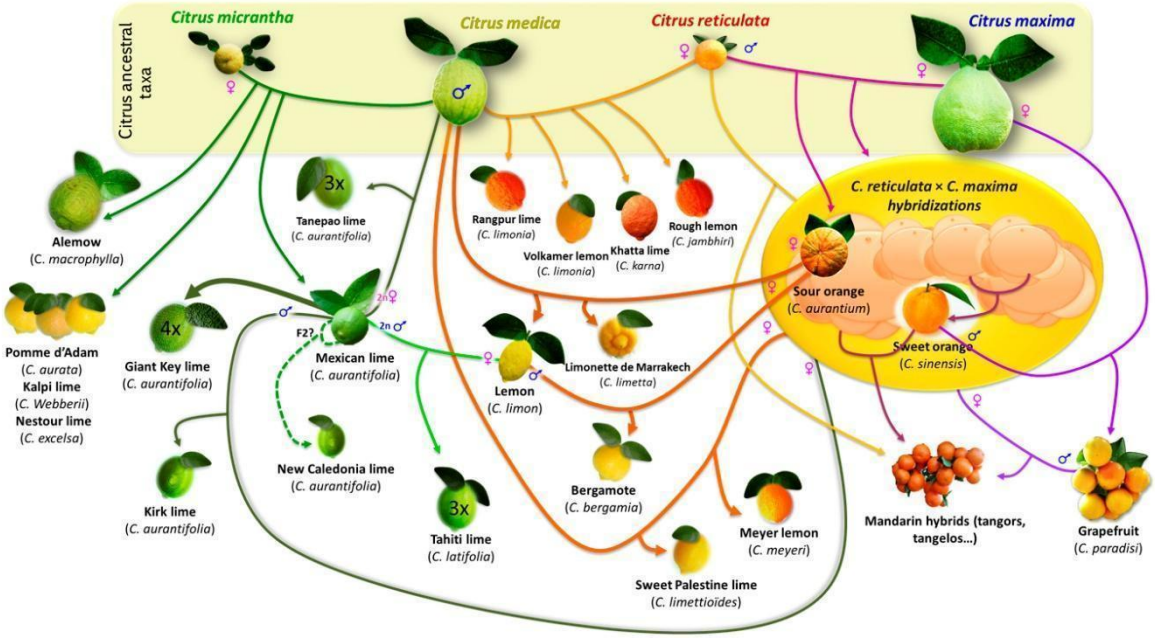

Figura 1. Cruzamento entre variedades de citros demonstrando sua derivação em novas variedades, com destaque para as quatro espécies ancestrais. Fonte: Curk et al. 2016.

Apesar das espécies ancestrais serem muito importantes para entendermos melhor a evolução do grupo, existem outras variedades que são de extrema importância industrial e econômica como os limões (*C. limon* Burm F.), as tangerinas (*C. reticulata* Blanco), as laranjas azedas (*C. aurantium* L.), as limas ácidas (*C. aurantiifolia* Swing.), as toranjas (*C. maxima* (Burm.) Merr.), as limas doces (*C. limettioides* Tan.), os pomelos (*C. paradisi* Macf.) e as laranjas doces (*C. sinensis* (L.) Osbeck) (CHAPOT, 1975; SOOST e CAMERON, 1975).

1.2. Citricultura no Brasil

Os citros foram introduzidos no Brasil pelos colonizadores portugueses, por volta de 1530, encontrando condições favoráveis de clima e solo no país (POMPEU JUNIOR e BLUMER, 2006). O cultivo de citros em escala comercial no Brasil teve início do século XVII; a partir de 1960 o país começou a exportar suco de laranja, e a investir fortemente em tecnologia para o avanço e consolidação da citricultura, o que fez com que, em 1980, o Brasil superasse os Estados Unidos e se tornasse o maior produtor mundial de laranja (NEVES et al., 2010). Atualmente, o país ainda ocupa esta posição (AMARO et al., 2021), com 16.729.410 toneladas de laranjas produzidas no ano de 2022, em aproximadamente 594 753 milhões de hectares plantados (IBGE, 2022).

O suco de laranja é a bebida à base de frutas mais consumida no mundo (COSMO e GALERIANI, 2020). O Brasil é responsável por mais de 50% da produção mundial de suco de laranja, ele é também o maior exportador mundial com 85% das exportações, o que corresponde a 95% da produção nacional (AMARO et al., 2021). Deste modo, o suco de laranja é o principal produto brasileiro exportado (CARVALHO et al., 2019). Estima-se que três de cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo são produzidos no Brasil (NEVES et al., 2010).

A citricultura apresenta grande importância para economia brasileira, arrecadando cerca de 189 milhões de dólares de impostos para o país e gerando 230 mil empregos diretos e indiretos (NEVES et al., 2010). Dentre os estados brasileiros, a Bahia se destaca como maior produtor de citros na região Nordeste, e segundo maior produtor de citros em escala nacional (cerca de 6,7% da produção) atrás apenas do estado de São Paulo (CARVALHO et al., 2019).

Apesar de ser uma grande cultura, diversos fatores vêm interferindo significativamente na produção citrícola no Brasil, sendo fatores abióticos como as variações climáticas, seca e temperaturas elevadas (STUCHI E GIRARDI, 2010), bem como fatores bióticos como pragas e doenças. Os fatores bióticos e abióticos que acometem os citros podem ocasionar grande

prejuízo econômico, reduzindo a produção e causando perda da qualidade dos frutos (COSMO e GALERIANI, 2020) (BASTOS et al., 2017). No período de 2001 a 2010 houve um aumento na mortalidade de citros que passou de 4% para 7,5% devido à ocorrência de pragas e doenças, causando a morte de 40 milhões de árvores e resultando na perda de quase 80 milhões de caixas dos frutos por ano (NEVES et al., 2010). Dentre estas, estão as doenças cusadas pelo oomiceto *Phytophthora* sp. (BASTOS et al., 2017).

1.3. *Phytophthora* em citros

Phytophthora é um gênero de oomicetos, classificados como Protoctista, sub-reino Stramenopila (KAMOUN et al., 2015), relacionado a diatomáceas. Apresentam morfologia semelhante aos fungos filamentosos (BOEVINK et al., 2020) e também apresentam características consideradas como exclusivas das plantas, tais como a celulose como sendo o principal componente da sua parede celular, diferente dos fungos verdadeiros nos quais a parede celular é composta de quitina (PERRINE-WALKER, 2020).

O gênero *Phytophthora* compreende aproximadamente 100 espécies, am sua maioria fitopatogênicas (KROON et al., 2012), com cerca de 24 espécies ocorrendo no Brasil (SANTOS e SANTOS, 2019). As espécies fitopatogênicas de *Phytophthora* são conhecidas por causar doenças destrutivas em culturas economicamente importantes como cacau, soja, abacaxi, maracujá, batata e citros (BOEVINK et al., 2020; PERRINE-WALKER, 2020; LESSA et al., 2020), bem como espécies florestais (SANTOS e SANTOS, 2019), ocasionando elevada perda na agricultura (DALIO et al., 2014), e impactando negativamente a segurança alimentar.

Nos citros, *Phytophthora* é responsável por causar uma doença popularmente conhecida como “gomose de *Phytophthora*” (BASTOS et al., 2017) gerando grandes perdas na produção, tanto no Brasil, quanto em outros países, uma vez que este fitopatógeno ocorre em praticamente todas as regiões produtoras de frutas do mundo (ERWIN e RIBEIRO, 1996). A disseminação da “gomose de *Phytophthora*” no Brasil se deu por volta de 1840 e a doença passou a ser considerada uma das infecções mais importantes para a citricultura (FEICHETNBERGER et al., 2001).

A “gomose de *Phytophthora*” compreende um complexo de doenças que podem ocorrer nos citros, e são provocadas por diferentes espécies, com prevalência para *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (*P. parasitica* Dastur) e *P. citrophthora* que são as espécies encontradas com maior frequência nas regiões citrícolas no Brasil (BASSAN et al., 2010). O

fitopatógeno infecta as principais ramificações da planta e pode ocorrer em diferentes estágios do desenvolvimento. Os sintomas são caracterizados pela podridão no caule e na raiz, levando a sintomas como clorose das folhas, lesões nos troncos, e exsudação de goma por fendas encontradas na casca das árvores, sendo este fato relacionado ao nome da doença (TIMMER e MENGE, 1993; ERWIN e RIBEIRO, 1996; FEICHETNBERGER et al., 2005).

Figura 2. Exsudação de goma em limoeiro infectado pelo oomiceto *Phytophthora* sp. Fonte: HidrauTecSP, 2022.

1.4. Ciclo de vida de *Phytophthora*

Phytophthora apresenta um ciclo de vida heterolítico com uma fase sexual e outra assexual, sendo que as estruturas reprodutivas são de extrema importância para a sobrevivência e desenvolvimento do fitopatógeno. Estas estruturas podem ser vegetativas se tratando dos micélios, ou germinativas como é o caso dos esporângios (zoósporos, clamidósporos e oósporos). Composto por hifas cenocíticas, o micélio é hialino e apresenta desenvolvimento vegetativo, pois seu desenvolvimento ocorre sobre substrato determinado (FEICHTENBERGER et al., 2005). O ciclo de vida sexual acontece na ausência de luz, onde ocorre a fusão dos gametas masculinos e femininos produzidos pelo esporângio, sendo eles os anterídios e oogônios, respectivamente, os quais formam os oósporos (esporo sexual)

(PERRINE-WALKER, 2020). Posteriormente os oósporos amadurecem em clamidósporos que germinam ao encontrar condições ambientais favoráveis, e o ciclo se reinicia.

Já durante a reprodução assexuada, sob condições ideais de temperatura e umidade, os esporângios produzem e liberam os esporos móveis biflagelados denominados zoósporos (KAMOUN, 2000) que são mais resistentes às adversidades ambientais pois permanecem encistados. No entanto, em condições favoráveis, esses cistos liberados encontram a superfície de contato ferida do hospedeiro e germinam para formar o micélio (ERWIN e RIBEIRO, 1996). Os zoósporos produzidos sobre os tecidos doentes necessitam de água livre para se locomoverem e infectarem a planta. Portanto, umidade elevada do solo, assim como temperatura entre 21 a 30º C, são fatores que favorecem o desenvolvimento da doença (COSTA, 2007). Por possuir a habilidade de se reproduzir por meio de esporângios e zoósporos, as doenças causadas pelas espécies do gênero *Phytophthora* são consideradas epidemiologicamente mais explosivas sob condições ambientais apropriadas (ERWIN e RIBEIRO, 1996).

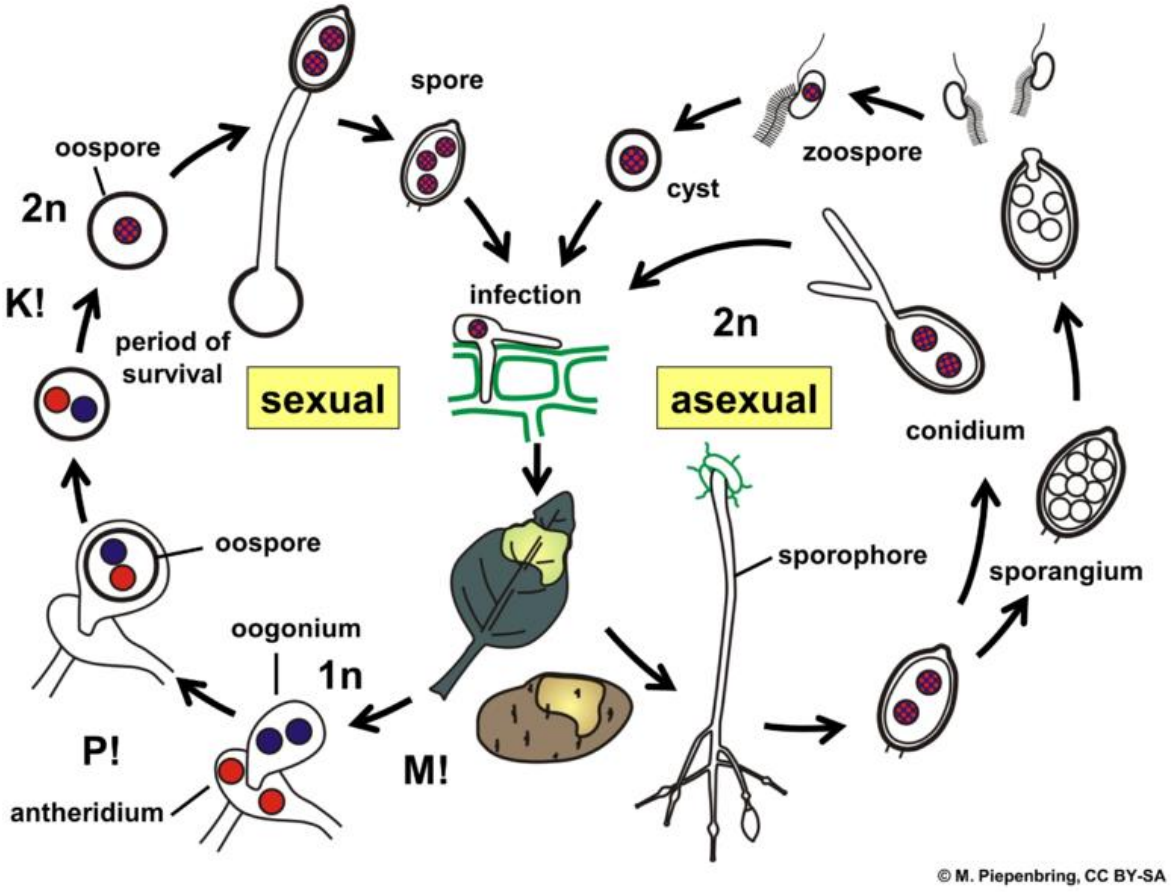

Figura 3. Ciclo de vida de *Phytophthora infestans* na batata. Fonte: Wikimedia commons.

Este fitopatógeno tem um ciclo de vida do tipo hemibiotrófico; na fase biotrófica utiliza estruturas especializadas muito parecidas com os haustórios para penetrar os tecidos vegetais e extrair nutrientes da célula infectada. Logo depois da infecção pelo fitopatógeno e a relação parasitária ter se tornado estável, inicia-se a fase necrotrófica na qual o micélio coloniza o tecido, causando uma lesão necrótica e posteriormente a destruição das células adjacentes (LUTTRELL, 1974; PARBERY, 1996; AMORIM e PASCHOLATI, 2011).

Devido às estruturas de resistência produzidas por *Phytophthora* sp., após a fixação do patógeno no solo, é praticamente impossível a sua eliminação (REZENDE et al., 2020). O que tem causado preocupação pois torna os frutos inviáveis para consumo e comercialização. Deste modo, tem sido um desafio proteger as plantas das espécies de *Phytophthora* (DALIO et al., 2014). Uma vez que, as estratégias de controle das doenças causadas por *Phytophthora* são muito limitadas, (ATTARD et al., 2014) é fundamental a compreensão dos mecanismos de interação da relação planta-patógeno.

1.5. Interação planta-patógeno

As plantas desenvolveram mecanismos de defesa contra fitopatógenos que lhes permitem reconhecer os possíveis invasores, e evitar a colonização da maioria dos microrganismos patogênicos. Deste modo, é mais comum que a planta apresente resistência do que suscetibilidade a infecções (BOEVINK et al., 2020).

As plantas podem responder a ataques por fitopatógenos de diversas maneiras como, entre outros, prevenindo a entrada do agente patogênico ou impedindo a progressão da infecção por meios mecânicos (SCHORNACK et al., 2010). As plantas por sofrerem constantes ataques de fitopatógenos iniciam os mecanismos de resistência através do reconhecimento de sinais exógenos oriundos dos patógenos (efetores); esses sinais, uma vez reconhecidos pela planta, resultam na ativação de vias de transdução de sinais levando à resistência, ou seja, à redução ou completa inativação da ação do patógeno nos tecidos da planta (AGRIOS, 2005; WALTERS et al., 2007). Essa resposta deve ocorrer de maneira eficiente, rápida e específica sendo uma das estratégias de sobrevivência da planta.

Portanto, o sucesso ou o fracasso de uma infecção depende da resposta imune das plantas, que deve ser superado pelo patógeno (DALIO et al., 2014). O sistema imunológico reconhece um patógeno por meio de um conjunto de receptores celulares denominados receptores de reconhecimento de patógenos ou padrões (PRRs) (CAVALCANTE et al., 2013). A resposta das plantas é tradicionalmente dividida em dois níveis, sendo o primeiro chamado

de Imunidade Desencadeada por Padrão (PTI), sendo padrões moleculares conservados produzidos por microrganismos ou gerados por meio das interações destes com a planta e depende do reconhecimento de moléculas associadas a patógenos (PAMPs). A segunda camada é denominada Imunidade Desencadeada por Efetores (ETI), a qual envolve o reconhecimento e respostas a moléculas efetoras de patógenos por receptores (BOENVICK, 2020). Uma abordagem mais recente propõe três camadas de defesa, sendo uma camada de reconhecimento, uma integração de sinal camada e uma camada de ação de defesa (WANG et al., 2019; BOENVICK, 2020).

Como outros exemplos de mecanismos de defesa das plantas no combate de fitopatógenos podemos citar: a produção de espécies reativas de oxigênios (ROS), as quais são associadas à necrose e morte celular. Outros tipos de resposta são: i) a produção pela planta de fito-hormônios como ácido salicílico, etileno e jasmonato envolvidos em vias metabólicas de resposta a estresses bióticos e abióticos (AGRIOS, 2005; GLAZEBROOK, 2005), ii) A produção de fitoalexinas, que são compostos químicos produzidos pelas plantas, as quais possuem ampla ação antimicrobiana pertencentes a diferentes grupos químicos, como os isoflavonóides e sesquicerpenais (BARROS et al., 2010), iii) o aumento da expressão de proteínas relacionadas à patogenicidade (proteínas PR) (FRITIG et al., 1998), iv) os inibidores de proteases, os quais conseguem evitar ou reduzir a ação de enzimas que decompõem proteínas de origem animal e microbianas, mas não as proteínas de origem vegetal (BARROS et al., 2010).

1.6. Inibidores de protease

As proteases, também conhecidas como peptidases ou enzimas proteolíticas, são um grupo de enzimas cujo a função é catalisar a quebra (hidrólise) das ligações peptídicas das proteínas e peptídeos (SILVA-LOPES, 2009). As proteases produzidas por microrganismos fitopatogênicos podem hidrolisar as proteínas da membrana e da parede celular de plantas hospedeiras facilitando a penetração e infecção (TREMACOLDI, 2009). O controle da atividade das proteases ocorre em dois níveis, sendo o primeiro nível a regulação da expressão gênica; já o segundo nível, considerado o mais importante, consiste na inibição da atividade das proteases, por meio da interação direta da enzima com inibidores específicos, denominados inibidores de proteases (KROWARSCH et al., 2003).

Os inibidores de protease atuam suprimindo a atuação das enzimas proteolíticas de microrganismos fitopatogênicos, constituindo, portanto, um importante mecanismo de defesa

das plantas contra infecções, podendo ser induzidos mediante ao ataque de um patógeno ou insetos. São sintetizados e estocados em órgão de reserva das plantas, como sementes e tubérculos, e podem ser inibidores de ocorrência natural, os quais são isolados de animais, plantas e bactérias e também de origem sintética (TREMACOLDI, 2009), a exemplo benzamidina que é um inibidor de tripsina, frequentemente utilizado em estudos como inibidor de proteases em insetos (CHÁVEZ et al. 2020).Os inibidores de proteases são moléculas com função reguladora, e são amplamente distribuídos na natureza, podendo ter origem vegetal, animal ou de microrganismos, controlam as proteases alvo, bloqueando ou alterando o acesso ao sítio ativo da proteína (COTABARREN et al., 2020).

Os inibidores de protease, principalmente de plantas, têm sido amplamente utilizados para diversas aplicações no setor médico e agrícola (DAMINELLI et al., 2010; SILVA et al., 2018). Dentre as aplicações dos inibidores de protease na agricultura, tem sido frequentemente investigado seu uso como mecanismo de proteção da planta contra pragas e patógenos, inibindo a atividade de proteases em artrópodes, a exemplo o estudo de Chávez et al. (2020) que avaliou o desempenho de inibidores sintéticos (benzamidina e berenil) sobre a atividade proteolítica intestinal de cochonilha-verde (*Coccus viridis)* em café *(Coffea arabica).*

1.7. Abordagem proteômica

O conjunto completo de proteínas expressas por um determinado indivíduo, tecido, cultura de células, entre outros, em um dado momento é chamado de proteoma (WILKINS et al., 1995). De modo geral, o proteoma consiste em um sistema altamente dinâmico, que apresenta variações em função de fatores ambientais e fisiológicos, bem como metabolismos, patologias e fase do ciclo celular. Assim, o proteoma de um determinado organismo em um determinado momento, representa a expressão fenotípica naquele instante específico (SALVATO et al., 2010).

A análise proteômica, ou análise do proteoma possibilita o estudo das proteínas em larga escala, bem como de suas isoformas (BARBOSA et al., 2012), visando a caracterização do conjunto de proteínas expressas em um dado momento, a partir de amostras biológicas (SALVATO et al., 2010), utilizando métodos bioquímicos (CELIS et. al.,1996; WILKINS et al.,1996; WILKINS et al.,1997). Os estudos de proteômica surgiram no final da década de 1970 (O'FARREL, 1975) e atualmente elas estão amplamente utilizadas, com destaque para o estudo de proteínas associadas ao sistema imunológico das plantas, as quais compõem os mecanismos de resistência a pragas e/ou microrganismos patogênicos (ROCHA et al., 2005; WU et al., 2013;

GUISSONI E CARDOSO, 2019), possibilitando a identificação de proteínas em células que sofreram infecção e também em células não infectadas**.**

A metodologia de um estudo proteômico consiste em duas etapas: separação e caracterização dos componentes do proteoma. As técnicas utilizadas para análises na primeira etapa são: eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE), técnicas de Cromatografía Líquida (CL) de Fase Reversa (FR-CLAE) e Ultra Eficiência (CLUE) (GUISSONI E CARDOSO, 2019). A análise por eletroforese bidimensional (2-DE) foi desenvolvida por O'Farrell e Klose em 1975, e é amplamente utilizada permitindo a obtenção de um mapa específico de proteínas, a identificação de isoformas da mesma proteína, já que são separadas por seus respectivos pontos isoelétricos e massas moleculares. O processo de separação é geralmente realizado em gel de poliacrilamida, o qual após coloração permite a visualização da proteína como uma mancha (spot). Esta técnica permite a obtenção de perfis bidimensionais completos de uma amostra, além de comparação entre diferentes amostras (O'FARRELL, 1975).

Dentre as metodologias disponíveis para caracterizar os compostos separados, a espectrometria de massas *in tandem* (MS / MS) é considerada a metodologia mais adequada (MAXWELL e FRAPPIER, 2007; WALTHER e MANN, 2010). A espectrometria de massas é uma técnica que surgiu no início do século XX, e permite a análise, identificação e quantificação de peptídeos de forma isolada, por comparação com banco de dados (CHALMERS e GASKELL, 2000). No contexto agronômico, as análises proteômicas contribuem significativamente para identificar nas plantas as proteínas relacionadas ao sistema imunológico das mesmas, as quais fazem parte dos mecanismos de resistência a pragas e/ou microrganismos patogênicos, auxiliando a compreensão da relação planta-patógeno (WU et al., 2013; GUISSINI e CARDOSO, 2019).

1.8. Abordagem interatômica

Redes são definidas como um conjunto de componentes que estão relacionados entre si (VERLI, 2014). As redes interatômicas, ou redes de interação proteína-proteína (PPI) permitem simular e classificar as interações existentes na natureza a partir de dados moleculares, possibilitando a compreensão dos organismos a nível de sistemas (ESPINDOLA et al., 2010; CHUANG et al., 2010; ANDRADE-SILVA et al., 2020). O interatoma é definido como o conjunto de interações físicas entre macromoléculas (e.g. proteínas, metabólitos) (SHARAN e

IDEKER, 2006). Deste modo, a aplicação de abordagem interatômica possibilita a identificação das interações existentes entre moléculas e a organização dessas interações em clusters funcionais para subsequente compreensão do papel biológico das moléculas consideradas (SALVATO et al., 2010).

O estudo em redes se originou na teoria dos grafos, e ganhou destaque devido ao avanço das ferramentas de bioinformática, e vem sendo utilizada para compreensão de diversos mecanismos biológicos (CHUANG et al., 2010). Um exemplo é este do estudo de Andrade Silva et al. (2020) cujo o objetivo era compreender a relação das proteínas envolvidas no processo de desenvolvimento de *Moniliophthora perniciosa*, um basidiomiceto hemibiotrófico causador da vassoura-de-bruxa no cacau (*Theobroma cacao* L.). Em citros, Santos et al (2020) analisaram as diferentes estratégias de tolerância à seca em condições de déficit hídrico nas variedades ‘Sunki Maravilha' e 'Sunki Tropical’. Os resultados encontrados evidenciaram que a variedade ‘Sunki Maravilha’ consegue tolerar a desidratação em uma condição de déficit hídrico, enquanto que ‘Sunki Tropical’ tende a evitar a desidratação, evidenciando a importância do estudo das redes de interação proteína-proteína para identificação de proteínas relacionadas à resposta ao estresse hídrico (MATTOS-MOREIRA et al., 2018).

Diante do que foi exposto, é possível constatar que a associação de estudos proteômicos com análises interatômicas vem promovendo avanço significativo na área vegetal com culturas economicamente importantes, como banana (MATTOS-MOREIRA et al., 2018), cacau (ANDRADE-SILVA et al., 2020; SANTOS et al., 2020; GOMES et al., 2021) e citros (SANTOS et al., 2021). No que se refere a interação planta-patógeno, este tipo de abordagem consegue evidenciar alterações ocorridas no proteoma vegetal durante o processo de infecção, identificando as proteínas expressas no hospedeiro como mecanismo de defesa ao ataque do patógeno (SANTOS et al., 2020).

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. Plant Pathology. London: Elsier, 2005.

AMARO, G. C.; FIDELIS, E. G.; MEDEIROS, C. M.; SILVA, R. S. Risco econômico potencial do ácaro-hindustânico-do-citros (*Schizotetranychus hindustanicus* Hirst) para produção de citros no Brasil. Comunicado Técnico Embrapa. 10 p, 2021.

AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo das relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 4. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, p. 59-99, 2011.

ANDRADE SILVA, E.M.; REIS, S.P.M.; ARGOLO, C.S.; GOMES, D.S.; BARBOSA, C.S.; GRAMACHO, K.P.; RIBEIRO, L.F.; SILVA, R.J.S.; MICHELI, F. *Moniliophthora perniciosa* development: key genes involved in stress-mediated cell wall organization and autophagy. International Journal Of Biological Macromolecules. v. 154, p. 1022-1035, 2020.

ATTARD, A.; EVANGELISTI, E.; KEBDANI-MINET, N.; PANABIERES, F.; DELEURY, E.; MAGGIO, C.; PONCHET, M.; GOURGES, M. Transcriptome dynamics of Arabidopsis thaliana root penetration by the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. BMC Genomics v. 15, n. 1, p. 538, 2014.

BARBOSA, E.B.; VIDOTTO, A.; POLACHINI, G.M.; HENRIQUE, T.; MARQUI, A.B.T.; TAJARA, E.H. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. Revista da Associação Médica Brasileira. v.58, n.3, p. 366-375, 2012.

BARKLEY, N.A.; ROOSE, M.L.; KRUEGER, R.R.; FEDERICI, C.T. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). Theoretical and Applied Genetics. v.112, p. 1519-1531, 2006.

BARROS, F.C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L.C.C.; JULIATTI, F.C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. Bioscience Journal. v. 26, n.2, p. 231-239, 2010.

BASSAN, M.N.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; FREIRE, B.F.S.; CANTUARIAS-AVILÉS, T.E.; BELTRAME, A.B. Reação de híbridos somáticos de citros a infecção por *Phytophthora nicotianae*. Revista Brasileira de Fruticultura. v. 32, n. 2, p. 429-435, 2010.

BASTOS, D.C.; SOMBRA, K.E.S.; LOUREIRO, F.L.C.; SILVA, A.C.C.; PASSOS, O.S. Initial development of Tahiti acid lime trees on different rootstocks in the semiarid region of Ceará, Brazi. Citrus Research & Technology. v. 38, n. 1, 2017.

BOEVINK, P.C.; BIRCH, P.R.J.; TURNBULL, D.; WHISSON, S.C. Devastating intimacy: the cell biology of plant phytophthora interactions. New Phytologist. v. 228, n. 2, p. 445-458, 2020.

CARVALHO, S.A.; GIRARDI, E.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; FERRAREZI, R.S.; COLETTA FILHO, H.D. Advances in citrus propagation in Brazil. Revista Brasileira de Fruticultura. v.41, n. 6, p. 1-36, 2019.

CASPERMEYER, J. Most Comprehensive Study to Date Reveals Evolutionary History of Citrus. Molecular Biology and Evolution, v. 32, n. 8, p. 2217.2-2218, 2015.

CAVALCANTE, P.; CUFI, P.; MANTEGAZZA, R.; BERRIH-AKNIN, R.; BERNASCONI, P.; PANSE, R.L. Etiology of myasthenia gravis: Innate immunity signature in pathological thymus. Autoimmunity Reviews. v. 12, p. 863-874, 2013.

CELIS, J.E.; GROMOV, P.; ØSTERGAARD, M.; MADSEN, P.; HONORÉ, B. DEJGAARD, K.; OLSEN, E.; VORUM, H.; KRISTENSEN, D.B.; GROMOVA, I.; HAUNSØ, A.; VAN DAMME, J.; PUYPE, M.; VANDEKERCKHOVE, J.; HOLM RASMUSSEN, H. Human 2-D PAGE databases for proteome analysis in health and disease: http://biobase.dk/cgi-bin/celis. FEBS Letters., v. 398, p. 129-134, 1996.

CHALMERS, M.J.; GASKELL, S.J. Advances in mass spectrometry for proteome analysis. Current Opinion in Biotechnology. v. 11, n.4, 348-390, 2000.

CHAPOT, H. The citrus plant. In: HÄFLIGER, E. (ed.). Citrus: Basle, Switzerland, CIBA-GEIGY Ltd., p.14-20. 1975.

CHÁVEZ, C.Y.L.; CORDEIRO, G.; SILVA, C.R.; SILVA, C.R.; CAMPOS, W.G.; OLIVEIRA, M.G.A. Efeito de inibidores de proteases na atividade enzimática de *Coccus viridis* em *Coffea arabica.* Revista de Ciências Agrárias. v. 63, p. 1-7, 2019.

CHUANG, H.Y.; HOFREE, M.; IDEKER, T. A decade of systems biology. Annual Review of Cell and Developmental Biology. v. 26, p. 721-744, 2010.

COSMO, B.M.N.; GALERIANI, T.M. Pragas dos citros: cochonilhas, pulgões, minador dos citros, cigarrinhas, bicho furão e mosca branca dos citros. Revista Agronomia Brasileira. v. 4, p.1-9, 2020.

COSTA, P.S.C. Expressão de genes em *P. nicotianae* que codificam proteínas indutoras de respostas de defesa em plantas. Tese Doutorado, Universidade Federal de Lavras, 2007, 55p.

COTABARREN, J.; LUFRANO, D.; PARISI, M.G.; OBREGÓN, W.D. Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. Plant science. v. 292, p. 1-24, 2020.

CURK, F.; ANCILLO, G.; GARCIA-LOR, A.; LURO, F.; PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J-P. Next generation haplotyping to decipher nuclear genomic interspecific admixture in Citrus species: analysis of chromosome 2. BMC Genetics, v. 15, n. 1, p. 152, 2014.

CURK, F.; OLLITRAULT, F.; GARCIA-LOR, A.; LURO, F.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P. Phylogenetic Origin of Limes and Lemons Revealed by Cytoplasmic and Nuclear Markers. Annals of Botany. v. 117, n.4, p. 565-583, 2016.

DALIO, R.J.D.; FLEISCHMANN, F.; HUMEZ, M.; OSSWALD, W. Phosphite Protects Fagus sylvatica Seedlings towards *Phytophthora plurivora* via Local Toxicity, Priming and Facilitation of Pathogen Recognition. Plos one. v. 9, n.1, p. 1-10, 2014.

DAMINELLI, E.N.; TRITINGER, A.; SPADA, C. Alterações hematológicas em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficência humana submetidos à terapia antirretroviral com e sem inibidor de protease. Revista Brasileira de Hematologia. v. 32, n. 1, p. 10- 15, 2010.

ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. Phytophthora diseases worldwide. St. Paul: The Americam Phytopathological Society, 1996.

ESPINDOLA, F.S.; CALÁBRIA, L.K.; REZENDE, A.A.A.; PEREIRA, B.B.; SANTANA, F.A.; AMARAL, I.M.R.; LOBATO, J.; FRANÇA, J.L.; MÁRIO, J.L.; FIGUEIREDO, L.B.; SANTOS-LOPES, L.P.; GOUVEIA, N.M.; NASCIMENTO, R.; TEIXEIRA, R.R.; REIS, T.A.; ARAÚJO, T.G. Recursos de bioinformática aplicados as ciências ômicas como genômica, transcriptômica, proteômica, interatômica e metabolômica. Bioscience journal. v. 26, n.3, p. 463-477, 2010.

FEICHETNBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JUNIOR, J. Doenças dos citros. Manual de fitopatologia - doenças das plantas cultivadas, v.2, p.239-269, 2005.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUZ, E.D.M.N.; MATSUOKA, K.; SANTOS, A.F. (Ed.). Doenças causadas por *Phytophtora* no Brasil. Piracicaba; Livraria Rural, p.283-342, 2001.

FRITING, B.; HEITZ, T.; LEGRAND, M. Antimicrobial proteins in induced plant defense. Current Opinion in Immunology. v. 10, n.1, p. 16-20, 1998.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review of Phytopathology. v. 43, p. 205-227, 2005.

GOMES, D.S.; SILVA, E.M.A.; ROSA, E.C.A.; GUALBERTO, N.G.S.; SOUZA, M.A.J.; SANTOS, G.; PIROVANI, C.P.; MICHELI, F. Identification of a key protein set involved in *Moniliophthora perniciosa* necrotrophic mycelium and basidiocarp development. Fungal genetics and biology. v. 157, p. 1-16, 2021.

GUISSONI, A.C.P.; CARDOSO, D.D.P. Proteômica: Uma ferramenta analítica. Revista Eletrônica de Ciências Humanas, Saúde e Tecnologia. v. 8, n. 1, p. 68-81, 2019.

KAMOUN, S. Phytophthora. In: KRONSTAD, J. (Ed.) Fungal pathology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.237-265, 2000.

KAMOUN, S.; FURZER, O.; JONES, J. D.; JUDELSON, H.S.; ALI, G.S., DALIO, R.J. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. Molecular. Plant Pathology. v.16, p. 413–434, 2015.

KROON, L.P.N.M.; BROUWER, H.; DE COCK, A.W.A.M.; GOVERS, F. The genus *Phytophthora* anno 2012. Phytopathology. v. 102, p. 348-364, 2012.

KROWARSCH, D.; CIERPICKI, T.; JELEN, F.; OTLEWSKI, J. Canonical protein inhibitors of serine proteases. CMLS Cellular and Molecular Life Sciences. v. 60, p. 2427–2444, 2003.

LESSA, I.Z.V.; LUZ, E.D.M.N.; MAGALHÃES, D.M.A.; BEZERRA, J.L.; PIRES, J.L. Morfologia e agressividade de isolados de *Phytophthora palmivora* de cacaueiro no estado da Bahia. v. 46, n.3, p. 228-235, 2020.

LURO, F. Recent insights on Citrus diversity and phylogeny In: AGRUMED: Archaeology and history of citrus fruit in the Mediterranean: Acclimatization, diversifications, uses [online]. Naples: Publications du Centre Jean Bérard, 2017.

LUTTRELL, E.S. Parasitism of fungi on vascular plants. Mycologia, New York, v. 66, n. 1, p. 1-15, 1974.

MATTOS-MOREIRA, L.A.; FERREIRA, C.F.; AMORIM, E.P.; PIROVANI, C.P.; ANDRADE, E.M.; COELHO FILHO, M.A.; LEDO, C.A.S. Differentially expressed proteins associated with drought tolerance in bananas (*Musa* spp.). Acta Physiologiae Plantarum. v. 50, n. 60, p. 1-14, 2018.

MAXWELL, K.L.; FRAPPIER L. Viral Proteomics. Microbiology and Molecular Biology Reviews. v. 71, n. 2, p. 398–411, 2007.

MOTA, S.G.R.; BARROS, T.F.; CASTILHO, M.S. In vitro Screening and Chemometrics Analysis on a Series of Azole Derivatives with Fungicide Activity Against *Moniliophthora perniciosa*. Journal of the Brazilian Chemical Society. v. 21, n. 3, p. 510-519, 2010.

NEVES, M.F. O retrato da citricultura brasileira. Markerstrat. Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing Estratégica. 137p. 2010.

O'FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. The journal of biological chemistry. v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

PARBERY, D.G. Trophism and ecology of fungi associated with plants. Biological Review. v. 71, p. 473-527, 1996.

PERRINE-WALKER, F. *Phytophthora palmivora–Cocoa* Interaction. Journal of Fungi. v. 6, n.67, p. 1-20, 2020.

POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER, S. A introdução de germoplasma: Uma contribuição ao melhoramento de citros. Laranja. v. 27, n.2, p. 341-354, 2006.

REZENDE, D.C.; BRANDÃO, D.F.R.; BRAND, S.C.; BLUMER, S.; PASCHOLATI, S.F.; MAFRA, N.M. Management of gummosis in citrus with potassium phosphite. Research, Society and Development, v. 9, n. 10, p. 1-21, 2020.

ROCHA, T.L.; COSTA, P.H.A.; MAGALHÃES, J.C.C.; EVARISTO, R.G.S.; VASCONCELOS, E.A.R.; COUTINHO, M.V.C.; PAES, N.S. Eletroforese bidimensional e analise de proteomas. Comunicado Técnico, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. v. 136, p. 1- 12, 2005.

SALVATO, F.; CARVALHO, M.C.C.G. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. Ciência Rural, Santa Maria, v.40, n.3, p.727-734, 2010.

SANTOS, A.S.; ANDRADE, E.M.; SOUSA, A.R.O.; COSTA, M.M.C.; TOGAWA, R.; GRYNBERG, P.; PIROVANI, C.P.; OLIVEIRA, S.A.S.; SOARES FILHO, W.S.; COELHO FILHO, M.A. Transcriptome profile of drought responsive candidate genes in varieties of citrus rootstocks with different tolerance strategies. Scientia Horticulturae. v. 277, p. 109838, 2021.

SANTOS, E.C.; PIROVANI, C.P.; CORREA, S.C.; MICHELI, F.; GRAMACHO, K.P. O patógeno *Moniliophthora perniciosa* promove modulação proteômica diferencial de genótipos de cacau com resistência contrastante à vassoura-de-bruxa. BMC Plant biology. v. 20, n.1, 2020.

SANTOS, F.; SANTOS, A.F. Morte de árvores de plátano causada por *Phytophthora cinnamomi*. Summa Phytopathology. v. 45, n. 2, p. 179-185, 2019.

SCHORNACK, S.; VAN DAMME, M., BOZKURT, T.O., CANO, L.M., SMOKER, M., THINES, M.; GAULIN, E.; KAMOUN, S.; HUITEMA, E. Ancient class of translocatedoomycete effectors targets the host nucleus. Proceedings of the National Academy of Sciences. v. 107, n. 40, p. 17421–17426, 2010.

SHARAN, R.; IDEKER, T. Modeling cellular machinery through biological network comparison. Nature Biotechnology. New York. v. 24, p. 427-433, 2006.

SILVA, J.; MARINHO, M.M.; SILVA, J.E.; MARINHO, E.M.; MARINHO, E.S. Estudo comparativo de docking molecular entre o inibidor de protease saquinavir e o carotenoide bixina como potencial inibidor do vírus HIV tipo I (1HXB). Revista Expressão Católica Saúde. v.3, n.1, 2018.

SILVA-LOPES, R.E. Inibidores de Proteases Oriundas de Plantas: Uma Abordagem Útil para o Desenvolvimento de Novos Fármacos. Revista Fitos. v.4, n.1, p. 108-119, 2009.

SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (eds.). Advances in fruit breeding. West Lafayette, Indiana: Purdue University Press, p.507-540, 1975.

STUCHI, E.S.; GIRARDI, E.A. Utilização de práticas culturais na citricultura frente ao huanglongbing. Embrapa documentos, 77p, 2010.

TIMMER, L.W.; MENGE, J.A. Phytophthora induced diseases in: TIMMER, L.W.; GARNSEY, J.S.M.; GRAHAM, H. Compendium of citrus diseases. Sant Paul: APS Press, 80 p, 1993.

TREMACOLDI, C.R. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. 1 ed. Belém, 44 p., 2009.

VERLI, H. Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 292 P, 2014.

WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. Induced resistance for plant defense – a sustainable approach to crop protection. Oxford: Blackwell, 2007.

WALTHER, T.C.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. Journal of Cell Biology. v. 190, n. 4, p. 491-500, 2010.

WANG Y.; TYLER, B.M.; WANG, Y. Defense and counter defense during plant-pathogenic oomycete infection. Annual Review of Microbiology. v. 73, p. 667–696, 2019.

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R.D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J.C.; JAN, J. X.; GOOLEY, A.A.; HUGHES, E.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIANS, K.L.; HOCHSTRASSER, D.F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. Nature Biotechnology, v.14, p. 61-65, 1996.

WILKINS, M. R.; WILLIANS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. Proteome research: new frontiers in functional genomics. Germany: Springer-Verlag, 1997. p 243.

WU, G.A.; TEROL, J.; IBANEZ, V.; LÓPEZ-GARCÍA, A.; PÉREZ-ROMÁN, E.; BORREDÁ, C.; DOMINGO, C.; TADEO, F.R.; CARBONELL-CABALLERO, J.; ALONSO, R. Genomics of the origin and evolution of Citrus. Nature. v. 554, n. 7692, p. 311-316, 2018.

WU, L.; HAN, Z.; WANG, S.; WANG, X.; SUN, A.; ZU, X.; CHEN, Y. Comparative proteomic analysis of the plant-virus interaction in resistant and susceptible ecotypes of maize infected with sugarcane mosaic virus. Journal of Proteomics. v. 89, p. 124-40, 2013.

CAPÍTULO 1:

Identificação de proteínas e processos envolvidos na resposta de citros a *Phytophthora* spp. através de análises proteômicas e de redes de interação proteína-proteína

RESUMO

O oomiceto *Phytophthora* é responsável por uma das infecções mais importantes nos citros; a compreensão dos mecanismos de interação planta-patógeno é importante afim de identificar moléculas da planta responsáveis pela resistência ao *Phytophthora.* Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver e analisar redes de interações de proteínas previamente identificadas por meio de abordagem proteômica em plantas resistentes (‘Citrumelo Swingle’) e suscetíveis (‘Sunki Maravilha’) infectadas (ou não) com *Phytophthora parasitica,* comparando as proteínas acumuladas nestas duas variedades durante a doença. Foram utilizados dados proteômicos obtidos em experimento prévio, o qual consistiu em três condições: (I) controle = plantas não submetidas ao ferimento e não inoculadas; (II) ferido = plantas submetidas ao ferimento; e (III) infectado = plantas infectadas com *P. parasitica.* Foi realizada a extração das proteínas totais do tecido foliar, as quais foram separadas por eletroforese bidimensional (2-DE), seguida de espectrometria de massas e busca no banco de dados. Foi realizado um teste *t* para análise do acúmulo de proteínas entre os tratamentos em cada variedade, e para seleção dos *spots* com diferença significativa ($p<0.05$) e posteriormente foram elaboradas redes de interação proteína-proteína (PPI). Ambas as variedades apresentaram proteínas diferencialmente acumuladas quando comparadas com o grupo controle, sendo: 28 proteínas para variedade suscetível (nove proteínas *down* acumuladas e 19 proteínas exclusivas); e 43 proteínas para a variedade resistente (nove proteínas *up* acumuladas, sete *down* acumuladas e 19 proteínas exclusivas). Assim, foi gerado uma rede contendo os dados de expressão “*up* acumulado” e/ou exclusivos, e outra contendo os dados de expressão “*down* regulado” para cada variedade estudada, totalizando quatro redes, das quais também foram obtidos os clusters e centralidade das redes. Por fim, após a análise funcional dos clusters foi possível observar que a interação planta-patógeno entre as duas variedades de citros testadas resultou em diferentes níveis de expressão de proteínas, principalmente proteínas relacionadas ao processo de fotossíntese e ao desenvolvimento da planta. Tal condição demonstra que plantas resistentes e suscetíveis infectadas por *P. parasitica* desencadearam respostas diferentes ao estresse, prevenindo de forma mais ou menos eficiente a entrada do patógeno nos tecidos e/ou impedindo a progressão da infecção.

Palavras-chave: citricultura; Interatômica; proteômica.

ABSTRACT

The oomycete *Phytophthora* is responsible for one of the most important infections in citrus; understanding the mechanisms of plant-pathogen interaction is important in order to identify plant molecules responsible for resistance to *Phytophthora*. Thus, the objective of this study was to develop and analyze protein interaction networks previously identified through a proteomic approach in resistant ('Citrumelo Swingle') and susceptible ('Sunki Maravilha') plants infected (or not) with Phytophthora parasitica, comparing the proteins accumulated in these two varieties during the disease. Proteomic data obtained in a previous experiment, which consisted of three conditions, were used: (I) control = plants not subjected to wounding and not inoculated; (II) injured = plants subjected to injury; and (III) infected = plants infected with P. parasitica. The extraction of total proteins from the leaf tissue was carried out, which were separated by two-dimensional electrophoresis (2-DE), followed by mass spectrometry and database search. A t test was performed to analyze protein accumulation between treatments in each variety, and to select spots with a significant difference ($p<0.05$) and subsequently protein-protein interaction networks (PPI) were elaborated. Both varieties showed differentially accumulated proteins when compared to the control group, as follows: 28 proteins for the susceptible variety (nine accumulated down proteins and 19 exclusive proteins); and 43 proteins for the resistant variety (nine accumulated up proteins, seven accumulated down proteins and 19 exclusive proteins). Thus, a network containing the “accumulated up” and/or exclusive expression data was generated, and another containing the “regulated down” expression data for each variety studied, totaling four networks, from which the clusters and centrality of the expressions were also obtained. networks. Finally, after the functional analysis of the clusters, it was possible to observe that the plant-pathogen interaction between the two citrus varieties tested resulted in different levels of protein expression, mainly proteins related to the photosynthesis process and plant development. This condition demonstrates that resistant and susceptible plants infected by *P. parasitica* triggered different responses to stress, more or less efficiently preventing the entry of the pathogen into the tissues and/or preventing the progression of the infection.

Keywords: citriculture; Interatomic; proteomics;

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de citros é uma cultura mundialmente importante. O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de citros e produtos derivados, com destaque para o suco de laranja (NEVES et al., 2010; AMARO et al., 2021). Assim, a citricultura apresenta grande importância para economia brasileira, gerando diversos empregos no setor (NEVES et al., 2010). No entanto, alguns fatores bióticos como pragas e doenças vêm interferindo significativamente na produção citrícola no Brasil, reduzindo a produção e a qualidade dos frutos, causando grande prejuízo econômico (BASTOS et al., 2017; COSMO e GALERIANI, 2020).

Uma das infecções mais importantes para a citricultura é a "gomose da *Phytophthora*" (FEICHETNBERGER et al., 2001), a qual é ocasionada pelo oomiceto *Phytophthora*. As espécies fitopatogênicas de *Phytophthora* são conhecidas por ameaçar a segurança alimentar, causando doenças destrutivas não apenas em citros, mas também em outras culturas economicamente importantes como cacau, soja, abacaxi, maracujá, batata, diminuindo a produção impactando diretamente na produção (BOEVINK et al., 2020; PERRINE-WALKER, 2020; LESSA et al., 2020). Deste modo, é necessário a compreensão dos mecanismos de interação da relação planta-patógeno, a fim de proteger as plantas de citros das espécies de *Phytophthora*.

A associação de estudos proteômicos com análises interatômicas vem promovendo avanço significativo na área vegetal com culturas economicamente importantes, pois são ferramentas frequentemente utilizadas no estudo de proteínas associadas ao sistema imunológico das plantas (ANDRADE-SILVA et al., 2020). No que se refere a interação planta-patógeno, a análise proteômica possibilita a identificação de proteínas presentes nas células infectadas e também em células não infectadas, auxiliando a compreensão dos mecanismos de resistência a pragas e/ou microrganismos patogênicos (ROCHA et al., 2005; WU et al., 2013; GUISSONI E CARDOSO, 2019). Por sua vez, as análises interatômicas, representada pelas redes de interação proteína-proteína (PPI) permitem identificar as alterações ocorridas no proteoma vegetal durante o processo de infecção do patógeno, identificando as proteínas expressas no hospedeiro como mecanismo de defesa (SANTOS et al., 2020).

Desta forma o objetivo deste estudo foi identificar e analisar moléculas (genes/proteínas) associados à redução do desenvolvimento de *Phytophthora* spp. em citros, para melhor compreensão de mecanismos de resistência do gênero, analisando dados

proteômicos através de redes de interação proteína – proteína, identificando clusters de proteínas e analisando com quais funções biológicas esses clusters estão associados.

.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Etapa experimental e obtenção dos dados

Os dados utilizados neste estudo foram obtidos do experimento previamente realizado por Dória (2018), no qual foi realizado um experimento com variedades de citros suscetíveis e resistentes a *Phytophthora*, a tangerineira 'Sunki Maravilha' (Citrus Sunki Hort. Ex Tan; Suscetível-S) e o citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*; Resistente-R), as quais foram inoculadas com *P. parasitica.* O experimento consistiu em três condições: (I) controle = plantas não submetidas ao ferimento e não inoculadas; (II) testemunha = plantas submetidas ao ferimento no caule; e (III) plantas infectadas com *P. parasitica* no caule. Foi realizada a extração das proteínas totais do tecido foliar para as três diferentes condições, sendo coletado 48 horas após a realização do processo de inoculação. As amostras foram liofilizadas e utilizadas para análises moleculares. A análise proteômica foi realizada utilizando a técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) seguida de espectrometria de massas e busca no banco de dados.

2.2. Análise estatística

Após a identificação das proteínas, foi realizado um teste t para comparação da média dos volumes obtidos dos *spots* em cada tratamento, e comparados aos valores do grupo 'controle', e com os valores dos grupos 'ferido' e 'infectado'. Para o presente estudo, foram selecionados apenas os *spots* que apresentaram diferença significativa entre os grupos (p= 0,05). As proteínas que apresentaram o valor do volume em apenas em uma das amostras da triplicata, o valor da média dos três volumes foi considerado zero. Além disso, os *spots* que apresentaram diferença em relação ao controle em ambas as condições (ferimento e infectado) não foram considerados. Finalmente os dados foram utilizados para confecção de um *heatmap* para ambas as variedades.

2.3. Criação de rede de interação proteína-proteína (PPI)

Foi elaborada uma rede de interação proteína-proteína (PPI), por meio do banco de dados String (STRING: *functional protein association networks*) (MERING et al., 2003), utilizando a espécie C*itrus sinensis* como organismo para a recuperação da rede. Após a identificação das proteínas no *National Center for Biotechnology* (NCBI), foram utilizados os arquivos contendo as proteínas identificadas das variedades resistente e suscetível de acordo com o resultado

estatístico obtido para criação dos arquivos multi-fasta. As sequências multi-fasta juntamente com os arquivos recuperados do banco de dados *string* foram transferidos para o subsistema linux (Ubuntu 20.04). O arquivo multi-fasta foi utilizado como *query* no blastp dentro do subsistema linux utilizando o pacote NCBI-Blast+, para a obtenção de sub-redes com valor de confiança superior a 700. Dentre estas, foram destacadas uma sub-rede contendo os dados de expressão "*up* regulado" e/ou exclusivos e, a segunda sub-rede contendo os dados de expressão "*down* regulado" para cada variedade estudada ('Sunki Maravilha e 'Citrumelo Swingle'), totalizando 4 sub-redes.

2.4. Obtenção de cluster e centralidade das redes

Para a obtenção dos clusters das redes obtidas, o arquivo das quatro redes foi aplicado no ambiente *R* utilizando o pacote *Igraph*, no qual foram obtidos quatro arquivos de cluster, sendo uma para cada rede específica. Os arquivos contendo os clusters de cada rede foram posteriormente utilizados como objeto dentro das redes; cada cluster foi representado com uma cor diferente.

As centralidades das redes foram obtidas por meio das análises de *Degree* e *Betweenness: a* primeira significa o grau do nó na rede determinado pela quantidade de nós adjacentes conectados ao nó em questão, sendo que o valor de *degree* determina o *hub;* já a segunda que é a intermediação, está ligada ao número de caminhos mais curtos que passam por um único nó, isso quer dizer que um valor alto de *betweenness* significa alta interação ou sinalização com outras proteínas, sendo que os valores altos de *betweenness* determina os *bottleneck*, em caso das duas centralidades altas temos proteínas *hub-bottleneck* e com os dois valores baixos temos proteínas comuns.

As proteínas foram categorizadas em: comum (C), quando o valor para *Degree* e *Betweenness* estava abaixo da média global da rede; *bottleneck* (B), quando apenas o valor da centralidade de *Betweenness* ficou acima do valor médio global da rede; *hub* (H), quando apenas o valor do *Degree* estava acima da média global da rede; e *hub-bottleneck* (HB), quando os valores de *Degree* e *Betweenness* foram superiores à média global da rede. Os arquivos contendo os tipos de centralidades também foram usados como objetos dentro das sub-redes, para a sua identificação realizada mudança na sua forma, sendo (C) representada por um círculo, (B) losango, (H) quadrado, e (HB) hexágono.

2.5. Análise de ontologia gênica

Para realização da análise de ontologia foi utilizado os *softwares Pannzer* (TORONEN e HOLM, 2022) e *Eggnog* (CANTALAPIEDRA et al., 2021) para obtenção do arquivo de referência da Gene Ontology. Os arquivos advindos dos programas passaram por uma triagem utilizando o sub-sistema linux, onde foi retirado do arquivo do *eggnog* os dados de ontologia com valores abaixo de 0.4. Em seguida os dois arquivos resultantes foram unidos, formando um único arquivo do qual foram retiradas as redundâncias existentes entre os dois arquivos anteriores. Posteriormente o arquivo gerado foi utilizado na plataforma *Cytoscape* utilizando o plugin bingo, no qual foi feita a ontologia para cada cluster.

3. **RESULTADOS**

Em ambas as variedades foram observadas proteínas diferencialmente acumuladas quando comparadas com o grupo controle, sendo 28 proteínas diferencialmente acumuladas para a variedade ‘Sunki Maravilha’ (suscetível) e 43 proteínas para a variedade ‘Citrumelo Swingle’ (resistente), (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Proteínas diferencialmente expressas com maior influência na variabilidade entre amostras controle e infectadas da variedade 'Sunki Maravilha'.

Spot	Accession	Proteína ID	Cobertura da sequência	Score	pI/MM (KDa)	Número de peptídeos	*P* valor ferimento	*P* valor inoculado	Log Fold Ferimento	Log Fold Inoculado	Expressão
5	XP_006481028.1	Uncharacterized protein LOC102629866 isoform X4	24,00%	354	6.51/25400	15	0.13330731	0.05940209	-0.398634844	-0.599474379	Down
20	XP_006474456.1	17.3 kda class II heat shock protein-like	30,00%	171	5.56/17915	7	0.22818148	0.055916582	-0.404572135	-1.202996584	Down
83	XP_006482131.1	Glutathione S-transferase DHAR3, chloroplastic	43,00%	364	8.74/29440	17	NA	0.033273664	0	3.579639166	Exclusivo
94	XP_006488195.1	L-ascorbate peroxidase, cytosolic isoform X2	29,00%	425	5.55/27724	12	0.09052919	0.001484423	-0.455086317	-1.071121341	Down
120	XP_006473528.1	Gamma carbonic anhydrase 1, mitochondrial	60,00%	473	6.09/29553	20	NA	0.022593341	0	3.211379312	Exclusivo
144	XP_006480695.1	Metacaspase-4	2,00%	65	5.01/45890	3	0.18607901	0.001167584	-0.291238957	-0.891553391	Down
169	AIU48762.1	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase family protein, partial	24,00%	372	5.94/33233	14	NA	0.037655581	0	2.620296278	Exclusivo
189	XP_006483030.1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta-1, mitochondrial	21,00%	461	5.83/39861	11	0.07340671	0.020593098	0.764825738	-0.56073639	Down
215	XP_006478917.1	Anthranilate N-methyltransferase-like	35,00%	237	5.20/39737	10	0.360763036	0.021120446	-0.244155069	-0.93340587	Down
274	XP_006486397.1	Ribulose bisphosphate	45,00%	1222	5.33/5126	44	0.06524858	0.046566491	-1.018363569	-1.247425074	Down

		carboxylase/oxygenase activase 1, chloroplastic isoform X1			9		2				
344	XP_006488950.1	Rubisco large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic	39,00%	1873	5.85/6508 6	47	0.11075890 4	0.025843109	-0.428621083	-1.03817035	Down
345	XP_006488950.1	Rubisco large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic	35,00%	857	5.85/6508 6	30	0.83273452	0.028460247	0.083181889	-1.0828333	Down
427	XP_015387775.1	Superoxide dismutase [Fe], chloroplastic-like isoform X3	11,00%	179	8.57/3007 6	5	NA	0.034078911	0	2.769512228	Exclusivo
428	XP_006470326.1	Carbonic anhydrase 2-like isoform X1	17,00%	131	6.67/3714 7	5	NA	0.025443817	0	2.53999006	Exclusivo
429	XP_006467509.1	Chlorophyll a-b binding protein of LHCII type 1	28,00%	165	5.14/2818 9	7	NA	0.051883571	0	2.656095121	Exclusivo
432	XP_006487372.1	Fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic	28,00%	467	8.19/4300 2	17	NA	0.001532439	0	4.138368062	Exclusivo
439	XP_006475931.1	Glycine dehydrogenase (decarboxylating), mitochondrial	16,00%	362	6.59/1159 12	18	NA	0.008806356	0	6.7794576	Exclusivo
441	BAF80472.1	PS1 reaction center subunit III, partial	33,00%	550	9.59/1524 9	17	NA	0.00270475	0	6.83318949	Exclusivo
443	XP_006481028.1	Uncharacterized protein LOC102629866 isoform X4	17,00%	343	6.51/2540 0	10	NA	0.006368841	0	3.666419545	Exclusivo
452	XP_006470326.1	Carbonic anhydrase 2-like isoform X1	28,00%	1372	6.67/3714 7	30	NA	0.054916865	0	5.680904732	Exclusivo
462	XP_006470326.1	Carbonic anhydrase 2-	16,00%	212	6.67/3714	7	NA	0.041494223	0	3.057709616	Exclusivo

		like isoform X1			7						
472	XP_006473721.1	Thioredoxin-like protein CDSP32, chloroplastic	18,00%	209	8.59/39336	12	NA	0.040869363	0	2.045876273	Exclusivo
480	XP_006471725.1	DNA-damage-repair/toleration protein DRT102-like	10,00%	180	5.03/33780	6	NA	0.00275054	0	2.690103416	Exclusivo
483	XP_006492781.1	Cysteine synthase-like	18,00%	202	8.29/41783	11	NA	0.034363799	0	2.696884091	Exclusivo
485	XP_006486350.1	60S acidic ribosomal protein P0	14,00%	114	5.26/34146	4	NA	0.007939618	0	3.097039898	Exclusivo
495	XP_006484736.1	Aspartic proteinase CDR1-like	15,00%	358	5.44/45880	9	NA	0.040193313	0	1.987819265	Exclusivo
496	XP_006470326.1	Carbonic anhydrase 2-like isoform X1	26,00%	416	6.67/37147	16	NA	0.006836179	0	3.411677068	Exclusivo
499	XP_006486397.1	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1, chloroplastic isoform X1	36,00%	660	5.33/51269	20	NA	0.006179493	0	2.734764527	Exclusivo

Tabela 2. Proteínas diferencialmente expressas com maior influência na variabilidade entre amostras controle e infectadas da variedade ‘Citrumelo Swingle’

Spot	Accession	Proteína ID	Cobertura da sequência	Score	pI/MM (KDa)	Número de peptídeos	*P* valor ferimento	*P* valor inoculado	Log Fold Ferimento	Log Fold Inoculado	Expressão
5	XP_006474598.1	Peroxiredoxin Q, chloroplastic	45,00%	432	9.54/ 23712	12	0.953611205877324	0.0110629358096194	0.018807674327144	0.83481224435649	up
7	ABI49027.1	ATP synthase CF1 beta subunit (chloroplast)	54,00%	1568	5.26/ 53660	40	0.370379738341708	0.0202313367738885	-0.304738226247394	-1.88492378746369	down
19	XP_015389396.1	Bis(5'-adenosyl) -triphosphatase-like	8,00%	52	8.66/24081	2	0.452367772549784	0.0175306753042558	-0.165701745474317	0.514070639311668	up
27	XP_006473233.1	ATP synthase subunit delta, chloroplastic	19,00%	612	8.87/25612	15	0.158269599099026	0.00406692552066247	-0.458292471453624	1.25280486227 99	up
34	XP_015387775.1	Superoxide dismutase [Fe], chloroplastic-like isoform X3	27,00%	242	8.57/30076	10	0.097302855833526 5	0.0415709358788195	-0.431936780169284	1.23329664243004	up
37	XP_006470326.1	Carbonic anhydrase 2-like isoform X1	32,00%	584	6.67/37147	20	0.080906451945127 8	0.023478145565695	-0.625917112197609	-1.73549813507253	down
47	XP_006466690.1	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	61,00%	3373	5.83/35583	101	0.208007067381496	0.0119637596830568	0.321749188841255	1.43900174148586	up
49	XP_006470501.1	Elongation factor 1-beta 2	14,00%	104	4.70/24221	3	0.106361058266559	0.0145861541324795	-0.519617574892616	-4.72083843163225	down
54	XP_006466953.1	Ferredoxin--NADP reductase, leaf-type isozyme, chloroplastic	22,00%	253	8.68/40737	12	0.107751562337029	0.0314152547334911	-0.609456221168623	-1.61268390626152	down
59	XP_006492781.1	Cysteine synthase-like	43,00%	709	8.29/41783	19	0.640932547616951	0.013613314963063	0.0551394903135548	-0.59648329156	down

										4514	
67	XP_006471453.1	Phosphoribulokinase, chloroplastic	26,00%	594	5.97/45558	25	0.565722836596599	0.0108755859257595	0.0837690330793469	0.601304366463187	up
80	XP_006488950.1	Rubisco large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic	29,00%	1051	5.85/65086	29	0.293246673953846	0.0262197359623937	-0.125067145978002	0.49105314710177	up
99	ABI49027.1	ATP synthase CF1 beta subunit (chloroplast)	60,00%	2588	5.26/53660	53	0.364714337447084	0.0190288963595377	-0.254842395625008	-1.11353624475536	down
118	XP_015387775.1	Superoxide dismutase [Fe], chloroplastic-like isoform X3	36,00%	788	8.57/30076	21	0.533395048492409	0.0594747497253085	0.15361698793208	1.74597107527289	up
128	XP_006495232.1	Lectin	7,00%	193	5.10/29300	3	0.305919215166007	0.0378063876023384	-0.450416122170019	-3.80726560960013	down
134	NP_001276070.1	Abscisic stress-ripening protein 2-like	15,00%	93	5.75/20038	6	0.32524123330055	0.00126305838971292	0.268535666350688	1.70503118341395	up
253	XP_006485837.1	Caffeic acid 3-O-methyltransferase-like	3,00%	48	6.32/37528	2	NA	0.0232799205878056	0	3.07615486955525	exclusivo
255	XP_006482893.1	Thylakoid lumenal 19 kda protein, chloroplastic	5,00%	94	5.87/25800	1	NA	0.00355305457595792	0	2.97838114198925	exclusivo
256	XP_006469964.1	Small heat shock protein, chloroplastic	11,00%	35	6.77/25952	2	NA	0.0546945126377368	0	2.80133389391562	exclusivo
257	XP_006490303.1	Sorbitol dehydrogenase-like isoform X1	18,00%	130	5.90/39781	7	NA	0.000889720103133702	0	2.81454768914026	exclusivo
262	XP_015388168.1	Triosephosphate isomerase, cytosolic	13,00%	104	5.73/27168	3	NA	0.0161981995201731	0	3.04580581232692	exclusivo
269	XP_006488334.1	Triosephosphate isomerase, cytosolic	10,00%	162	5.76/27451	4	NA	0.0167857780341794	0	3.07729484841492	exclusivo
273	XP_015385975.1	Disease resistance	1,00%	31	6.81/138	1	NA	0.0016710922	0	2.73408237438	exclusivo

		protein RPS4-like			872			8832038		425	
277	XP_006466826.1	Gamma carbonic anhydrase 1, mitochondrial	4,00%	30	6.32/29841	2	NA	0.000110021747225063	0	3.12754854228837	exclusivo
279	XP_006481907.1	Enolase	18,00%	188	5.54/47986	9	NA	0.00697908983411223	0	3.08954956175293	exclusivo
280	XP_006476057.1	Probable lactoylglutathione lyase, chloroplastic	33,00%	550	6.56/41796	26	NA	0.000123226973060038	0	2.85659866239211	exclusivo
314	XP_006473010.1	Annexin D2-like	37,00%	267	5.30/19837	10	NA	0.00473051412101202	0	2.81644064976889	exclusivo
319	XP_006486397.1	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1, chloroplastic isoform X1	17,00%	143	5.33/51269	10	NA	0.00100413253597419	0	2.97031254223529	exclusivo
328	XP_006490894.1	Arginase 1, mitochondrial	14,00%	202	5.89/37135	6	NA	0.00378815635111007	0	2.70652907908398	exclusivo
331	XP_006487372.1	Fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic	15,00%	339	8.19/43002	8	NA	0.00209123962573682	0	2.87906987332059	exclusivo
347	XP_006471673.1	GDP-mannose 3,5-epimerase 1	25,00%	186	5.94/42717	9	NA	0.000181022236690915	0	2.7248939742139	exclusivo
350	XP_006473831.1	Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase GAPB, chloroplastic	12,00%	185	7.10/48429	6	NA	0.00254237482212096	0	2.83647626078635	exclusivo
367	XP_006473635.1	ATP sulfurylase 2	19,00%	290	7.28/53573	15	NA	0.00570235226489856	0	2.63939425470958	exclusivo
381	ABI49027.1	ATP synthase CF1 beta subunit (chloroplast)	19,00%	402	5.26/53660	11	NA	0.0151539717068577	0	2.63640343868153	exclusivo
386	XP_006483351.1	DEAD-box ATP-dependent RNA	2,00%	66	5.35/48709	2	NA	0.00374684340489839	0	2.71382336455904	exclusivo

		helicase 56									
388	XP_006493789.1	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic	12,00%	115	8.20/49587	6	NA	0.0292697824774222	0	4.71426566945611	exclusivo
453	XP_006474456.1	17.3 kda class II heat shock protein-like	41,00%	352	5.56/17915	15	NA	0.0133790637323725	0	3.30060356666576	exclusivo
463	XP_015387775.1	Superoxide dismutase [Fe], chloroplastic-like isoform X3	20,00%	110	8.57/30076	6	NA	0.016091091144836	0	3.01887626454363	exclusivo
500	XP_006490701.1	Non-functional NADPH-dependent codeinone reductase 2-like	29,00%	290	6.04/37349	13	NA	0.0100023498534733	0	3.25926746459181	exclusivo
545	XP_006486397.1	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1, chloroplastic isoform X1	54,00%	1753	5.33/51269	51	NA	0.000109652752985878	0	3.45300388570374	exclusivo
548	XP_006474456.1	17.3 kda class II heat shock protein-like	9,00%	84	5.56/17915	2	NA	0.00010963364101123	0	3.21874320162554	exclusivo
554	XP_006486398.1	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic isoform X2	28,00%	343	5.94/47218	24	NA	0.000109637294622961	0	3.26913790266524	exclusivo
562	XP_006464566.1	Actin-7	2,00%	88	5.31/41911	2	NA	0.00010963627581448	0	3.27888800802196	exclusivo

Das 28 proteínas obtidas para a variedade ‘Sunki Maravilha’ (suscetível), nove proteínas foram *down* acumuladas, todas as demais 19 proteínas, foram exclusivamente acumuladas, não havendo proteínas *up* acumuladas (Figura 1).

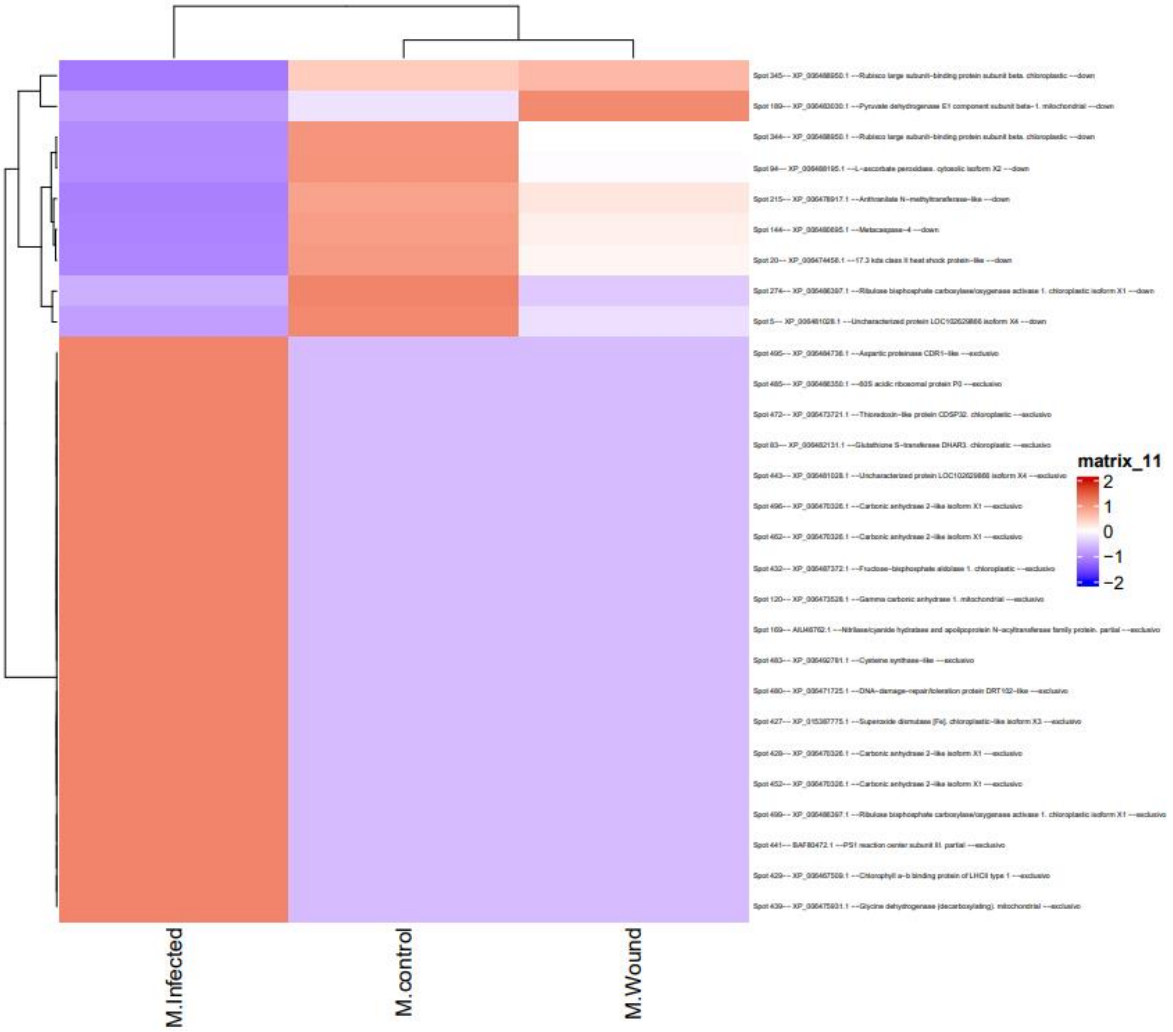

Figura 1. *Heatmap* do acúmulo de proteínas da variedade de citrus ‘Sunki Maravilha’ (suscetível) infectada com *Phytophthora* spp, utilizando o valor médio das triplicatas para os grupos controle infectado e ferido.

Para os tratamentos da variedade ‘Citrumelo Swingle’ (resistente), nove proteínas foram *up* acumuladas, sete proteínas foram *down* acumuladas e todas as demais 27 proteínas foram exclusivamente acumuladas (Figura 2).

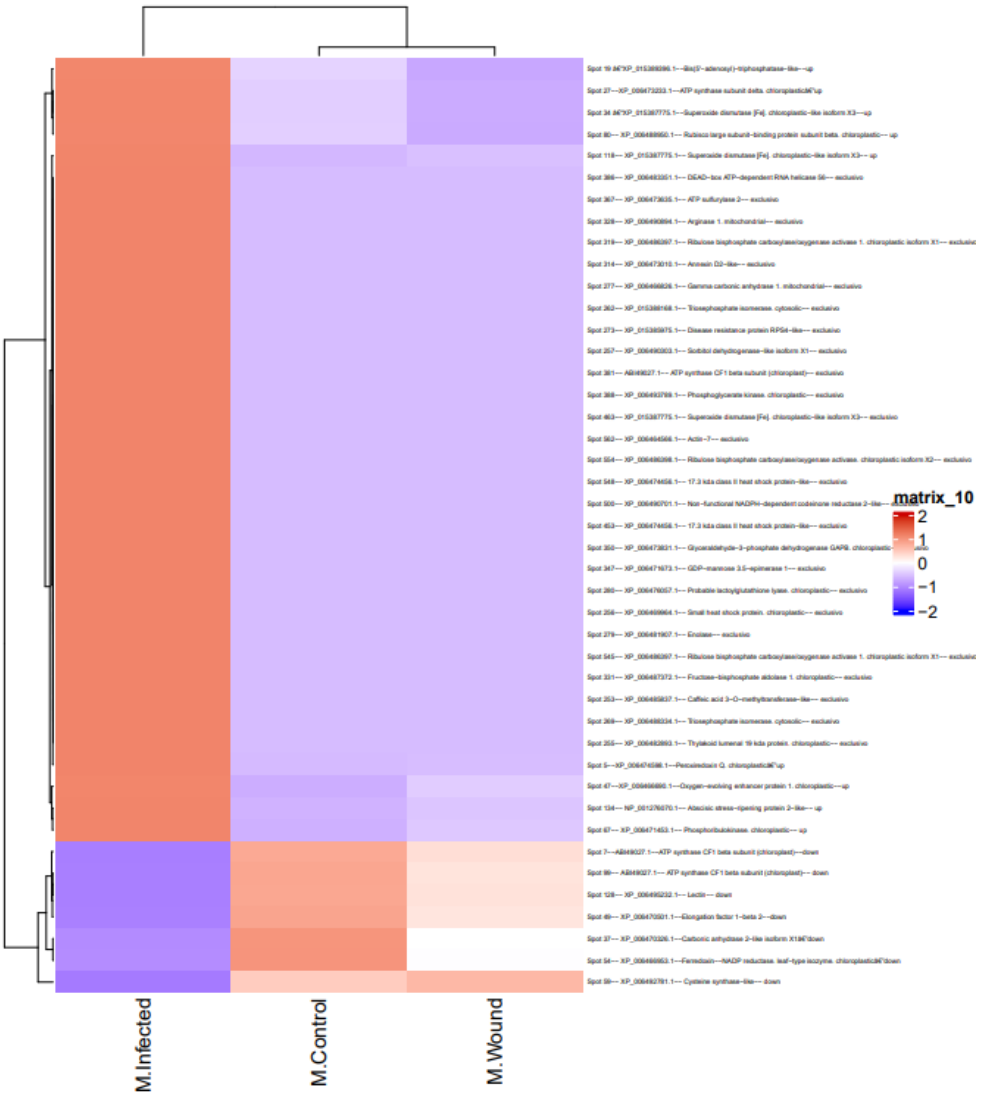

Figura 2. *Heatmap* do acúmulo de proteínas da variedade de citrus ‘Citrumelo Swingle’ (resistente) infectada com *Phytophthora* spp, utilizando o valor médio das triplicatas para os grupos controle infectado e ferido.

As quatro redes obtidas utilizando as proteínas encontradas nas variedades ‘Sunki Maravilha’ (suscetível) e ‘Citrumelo Swingle’ (resistente) apresentaram características diferentes entre elas. Por exemplo, as redes obtidas da variedade suscetível, na qual foi utilizada as proteínas exclusivas e *up* acumuladas em relação ao tratamento infectado, apresentou três clusters: o cluster 1 apresentou 424 processos funcionalmente enriquecidos para as atividades celulares; o cluster 2 apresentou 119 processos funcionalmente enriquecidos e o cluster 3 apresentou 129 processos funcionalmente enriquecidos. Das 13 proteínas utilizadas como *input*, cinco são do tipo (HB), sendo quatro proteínas pertencentes ao cluster 1 e uma pertencente ao cluster 2; duas são do tipo (H), pertencentes ao cluster 1 e as demais são do tipo (C) e também pertencentes ao cluster 1 (Figura 3).

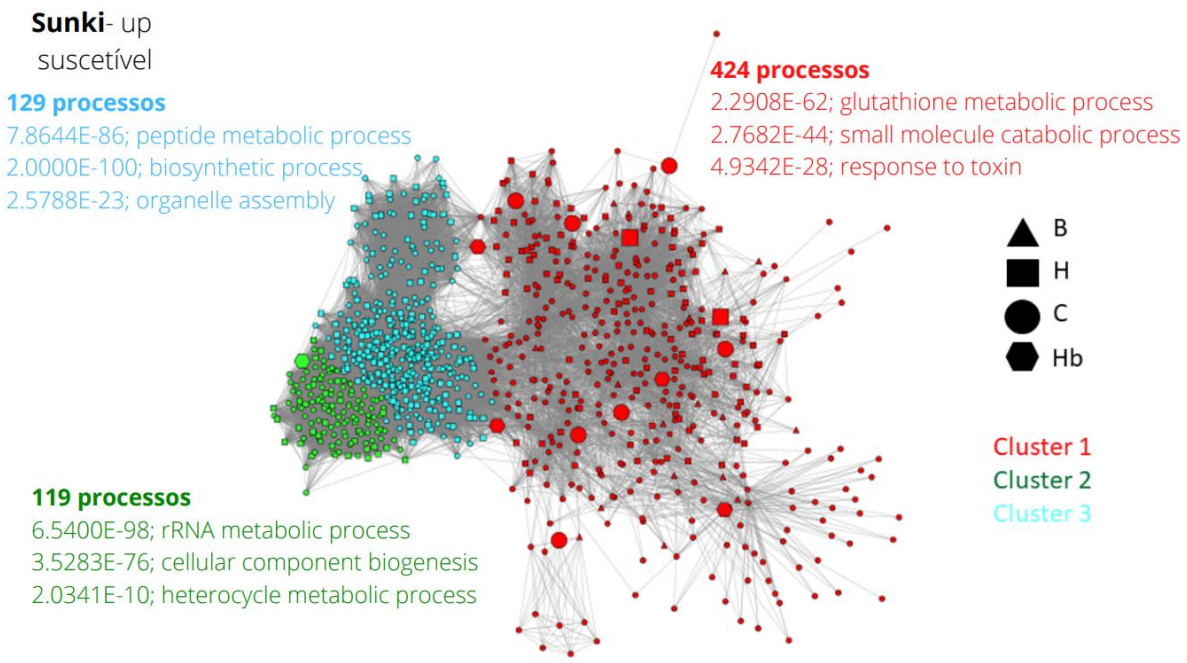

Figura 3. Rede de interação proteína-proteína da variedade de citros 'Sunki Maravilha' utilizando proteínas *up* acumuladas e exclusivamente acumuladas após ferimento e/ou infecção por *Phytophthora* spp. Onde: triângulo representa proteínas *bottleneck* (B); quadrado representa proteínas *hub* (H); circunferência representa proteínas comuns (C); hexágono representa proteínas *hub-bottleneck* (HB).

A rede contendo as proteínas que tiveram diminuição no acúmulo para o tratamento infectado na mesma variedade contém 5 clusters, sendo que o cluster 1 apresentou-se enriquecido para 107 processos; cluster 2 foram verificados 101 processos; cluster 3 foi verificado 44 processos; o cluster 4 verificou-se 85 processos, e por fim, o cluster 5 apresentou 234 processos. Das seis proteínas *down* acumuladas utilizadas na produção da rede, três proteínas são do tipo (HB) sendo duas pertencente ao cluster 2 e uma pertencente ao cluster 5; uma proteína (B) pertencente ao cluster 3 e duas proteínas (C), sendo uma pertencente ao cluster 5 e a outra ao cluster 4 (Figura 4).

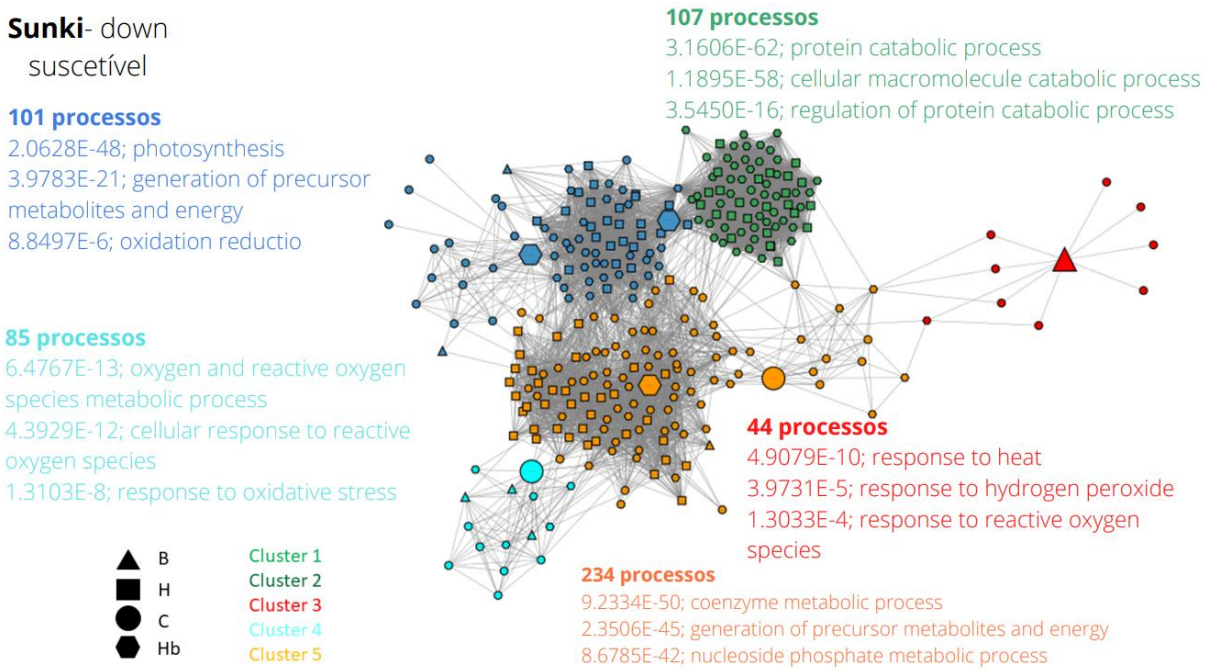

Figura 4. Rede de interação proteína-proteína da variedade de citros 'Sunki Maravilha' utilizando proteínas *down* acumuladas após ferimento e/ou infecção por *Phytophthora* spp. Onde: triangulo representa proteínas *bottleneck* (B); quadrado representa proteínas *hub* (H); circunferência representa proteínas comuns (C); hexágono representa proteínas *hub-bottleneck* (HB).

Para a variedade 'Citrumelo Swingle' (resistente), as proteínas exclusivas, acrescentadas das proteínas *up* acumuladas foram usadas na produção de rede, correspondendo a um aumento no acúmulo de proteínas, sendo que nessa rede foram encontrados seis clusters: o cluster 1 apresentou 114 processos; cluster 2 apresentou 581 processos; cluster 3 apresentou 442 processos; cluster 4 apresentou 100 processos; cluster 5 apresentou 117 processos e o cluster 6 apresentou 10 processos. Das 25 proteínas usadas como *input*, 12 são (HB), sendo cinco pertencentes ao cluster 5, cinco pertencentes ao cluster 2 e duas pertencente ao cluster 3; duas proteínas são do tipo (B), sendo que uma pertence ao cluster 3 e a outra ao cluster 2; duas proteínas são (H), sendo as duas pertencentes ao cluster 2 e todo o restante foi do tipo (C) (Figura 5).

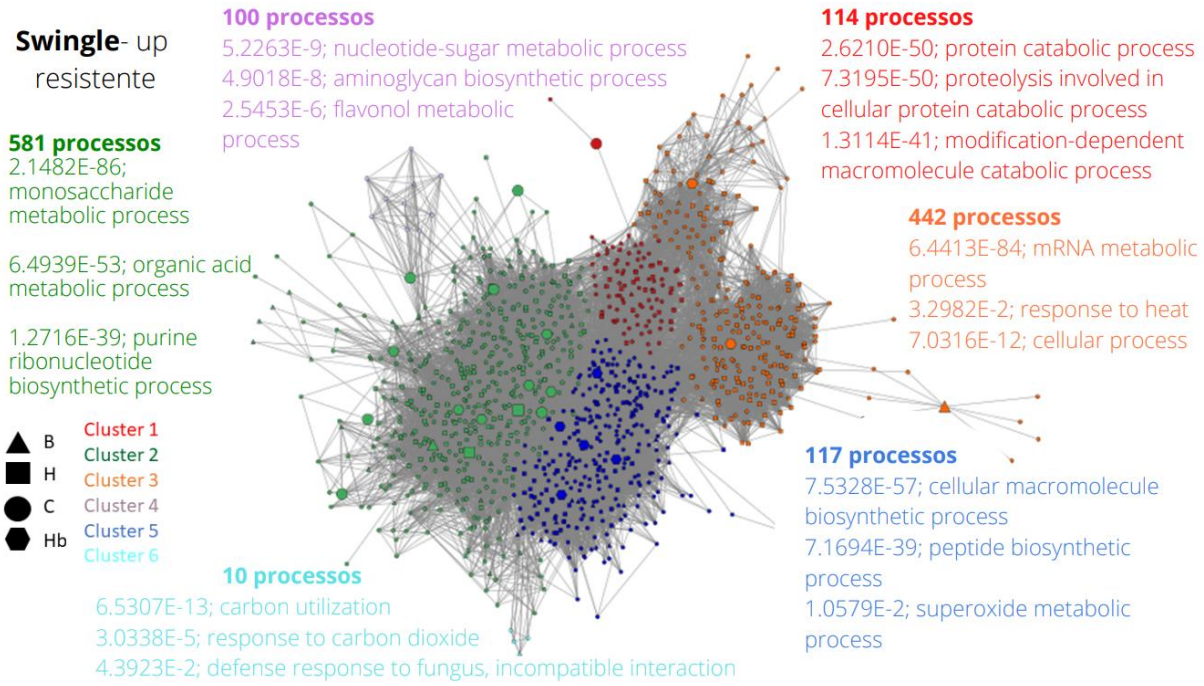

Figura 5. Rede de interação proteína-proteína da variedade de citros 'Citrumelo Swingle' utilizando proteínas *up* acumuladas e exclusivamente expressas após ferimento e/ou infecção por *Phytophthora* spp. Onde: triangulo representa proteínas *bottleneck* (B); quadrado representa proteínas *hub* (H); circunferência representa proteínas comuns (C); hexágono representa proteínas *hub-bottleneck* (HB).

Ainda para a variedade resistente, na rede contendo a diminuição do acúmulo de proteínas foram encontrados quatro clusters: o cluster 1 apresenta 81 processos; cluster 2 temos 435 processos; o cluster 3 apresenta oito processos e o cluster 4 apresentou 99 processos. Das seis proteínas utilizadas como *input*, três são do tipo (HB), sendo duas pertencentes ao cluster 2 e uma pertencente ao cluster 1; três proteínas foram do tipo (C), sendo que duas foram pertencentes ao cluster 2 e uma pertencente ao cluster 3 (Figura 6).

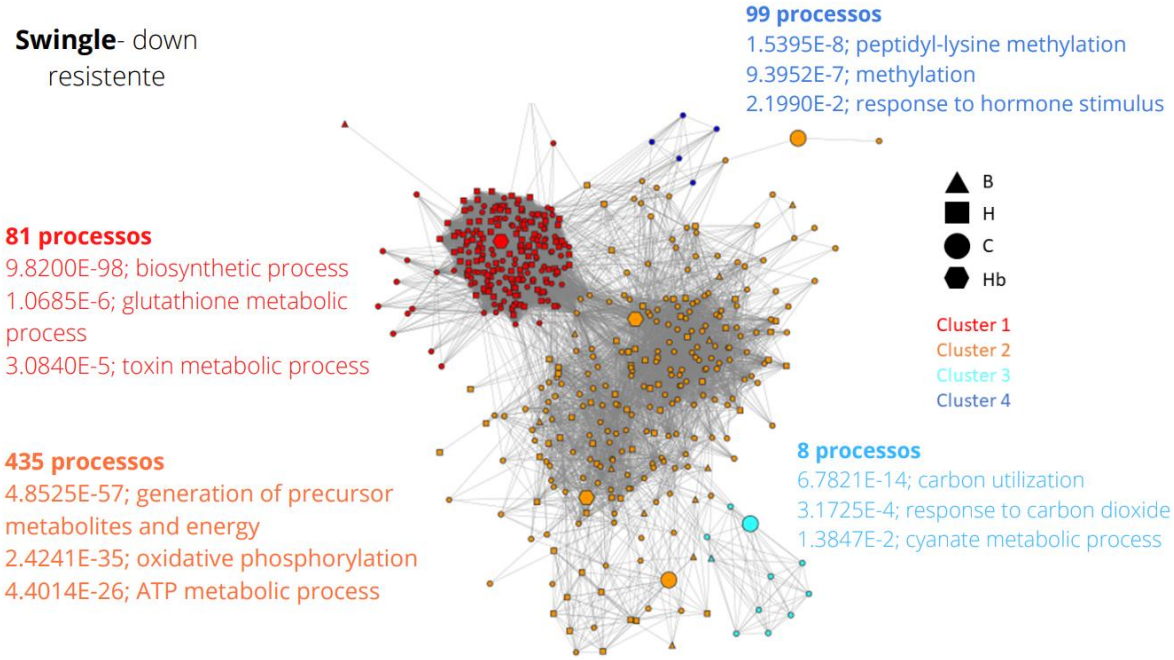

Figura 6. Rede de interação proteína-proteína da variedade de citros 'Citrumelo Swingle' utilizando proteínas *down* acumuladas após ferimento e/ou infecção por *Phytophthora* spp. Onde: triangulo representa proteínas *bottleneck* (B); quadrado representa proteínas *hub* (H); circunferência representa proteínas comuns (C); hexágono representa proteinas *hub-bottleneck* (HB).

4. DISCUSSÃO

A interação planta-patógeno entre as duas variedades de citros testadas (‘Sunki Maravilha’ e ‘Citrumelo Swingle’) com *Phytophthora* sp. resultou em diferentes níveis de expressão de proteínas entre as duas variedades. Tal condição está relacionada ao fato de que plantas resistentes e suscetíveis infectadas por fitopatógenos desencadeiam respostas diferentes ao estresse, prevenindo de forma mais ou menos eficiente a entrada do patógeno nos tecidos e/ou impedindo a progressão da infecção. Deste modo, as plantas tendem a produzir enzimas para combater a infecção, podendo ser elas enzimas que combatem o acúmulo de espécies reativas a oxigênio (ROS), proteínas receptoras de reconhecimento de patógenos ou padrões PRRs, além de proteínas de vias metabólicas responsivas ao estresse biótico e abiótico (AGRIOS, 2005; GLAZEBROOK, 2005).

O presente estudo identificou a expressão de proteínas relacionadas ao sistema de defesa da planta em ambas as variedades, como a proteína Superoxide dismutase [Fe], a qual apresenta grande relação com o combate ao acúmulo de ROS, desencadeado pela infecção por fitopatógenos (MITTLER et al., 2004) As proteínas aumentaram o acúmulo tanto para a variedade suscetível quanto na variedade resistente.

A proteína 17.3 kDa class II heat shock protein−like, apresentou aumento no seu acúmulo na variedade resistente, diferente da variedade suscetível que teve seu acúmulo diminuído. Segundo Zhang et al. (2020) essa proteína está ligada a resposta ao estresse, e é altamente conservada entre as plantas, sendo uma proteína chaperona, ou seja, sendo capaz de se ligar a outras proteínas e assim de manter a sua estrutura e a função impedindo que elas se agreguem ou sejam danificadas por estressores ambientais, como altas temperaturas, radiação UV e estresse hídrico.

Outra proteína importante nesse estudo foi a L-ascorbate peroxidase, cytosolic, também conhecida por APX, encontrada na variedade suscetível, mas não na variedade resistente. Na variedade suscetível, essa proteína teve diminuição do seu acúmulo. No estudo realizado por Najami et al. (2008), a expressão da APX foi significativamente induzida em plantas de tomate após a infecção com o patógeno *Pseudomonas syringae pv. tomato* (Pst). Além disso, a supressão da expressão da APX2 aumentou a suscetibilidade das plantas à infecção por Pst. Esses resultados indicam que a APX2 desempenha um papel importante na resistência das plantas contra patógenos (NAJAMI et al. 2008). Outras proteínas relacionadas à interação

planta-patógeno, apresentaram diferenças significativas nos seus níveis de acúmulos entre as duas variedades, e apresentando também aumento ou redução de expressão das proteínas identificadas.

Para a variedade suscetível, às proteínas Glutathione S−transferase DHAR3, chloroplastic, DNA−damage−repair/toleration protein DRT102−like, Glycine dehydrogenase (decarboxylating), mitochondrial e Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N−acyltransferase family aumentaram o acúmulo. Por outro lado, a proteína Anthranilate N−methyltransferase−like reduziu o acúmulo, além das proteínas APX e HSP17.3 comentadas anteriormente.

Na variedade resistente foi verificado o acúmulo das proteínas Caffeic acid 3−O−methyltransferase−like (COMT-like), ATP synthase CF1 beta subunit, e Actin−7. A COMT-like é uma enzima envolvida na síntese de lignina e é muito importante para composição da parede celular; é sabido que a presença de lignina desempenha um papel importante no combate contra fitopatógenos (CAO et al., 2021). A actin-7 é responsável pela organização celular e movimento celular das plantas, compondo o seu citoesqueleto, além de também estar relacionada a defesa contra fitopatógenos como fungos e oomicetos, sendo sua função a remodelagem do seu citoesqueleto durante a resposta imune inata contra fitopatógenos (LI et al., 2019). Esta correlação no aumento de acúmulo juntamente com a função de defesa contra fitopatógenos demonstra uma possível resposta imune contra a infecção de *Phytophthora* sp.

As proteínas relacionadas com o processo de fotossíntese e crescimento vegetal tendem a diminuir seu acúmulo nas plantas que estão infectadas por fitopatógenos (GARAVLAGIA et al., 2010). No presente estudo esta condição não foi observado para a variedade ‘Sunki Maravilha’, visto que, houve um aumento no acúmulo das proteínas Fructose−bisphosphate aldolase 1; Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1 isoform X1; Carbonic anhydrase 2−like isoform e PS1 reaction center subunit III partial. Além de apresentar diminuição no acúmulo das proteínas 17.3 kda class II heat shock protein−like; L−ascorbate peroxidase, cytosolic isoform X2 e Anthranilate N−methyltransferase−like que são proteínas envolvidas em resposta de defesa contra fitopatógenos (NAJAMI et al., 2008; HE et al., 2022).

A variedade ‘Citrumelo Swingle’ também apresentou aumento no nível de acúmulo de proteínas relacionadas à fotossíntese e ao crescimento vegetal, como é o caso da Triosephosphate isomerase; Rubisco large subunit−binding protein subunit beta; Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1isoform X1; Fructose−bisphosphate aldolase 1,

dentre outras proteínas; no caso das proteínas que tiveram diminuição no acúmulo, temos como exemplo a Ferredoxin−−NADP reductase, leaf−type isozyme, chloroplastic e Elongation factor 1−beta 2 que são proteínas que estão atreladas a fotossíntese a ao crescimento vegetal (WOJCICK-JAGLA et al., 2020).

Em ambos os casos houve aumento no acúmulo de proteínas relacionadas à fotossíntese e ao crescimento vegetal. No entanto, na variedade resistente foi observado também o aumento no acúmulo de muitas outras proteínas relacionadas à defesa da planta, quando comparadas com a variedade suscetível. Por outro lado, a grande maioria das proteínas que apresentaram diminuição no acúmulo, estão relacionadas à fotossíntese e ao crescimento vegetal, o que não ocorre para a variedade suscetível, conforme demostrado no trabalho de Scharte et al. (2005) que demostra que as proteínas responsáveis pela fotossintese tentem a diminuir o acumulo quando infectadas por *Phytophthora nicotianae*. Apesar do aumento do acúmulo de proteínas relacionadas à fotossíntese em ambos os casos, essas diferenças observadas entre 'Sunki Maravilha' (suscetível) e 'Citrumelo Swingle' (resistente) demonstra diferenças metabólicas importantes entre as duas variedades em respostas a infecção por fitopatógenos.

A análise realizada a partir das redes de interação proteína-proteína (PPI) possibilitou a comparação entre os conjuntos de proteínas encontradas nas duas variedades, bem como, a relação entre as proteínas dentro dos clusters encontrados para as quatro redes obtidas. As redes PPI são ferramentas valiosas para o estudo de proteínas em um contexto sistêmico. Em particular, estas redes podem auxiliar o entendimento de como proteínas com aumento ou diminuição de acumulação em um experimento podem estar interagindo com outras proteínas em uma célula ou tecido (BRAUN et al., 2013).

As redes obtidas no presente estudo a partir das proteínas anteriormente analisadas, revelaram as interações proteínas-proteínas e determinados clusters importantes, além de determinar o tipo de centralidade que as proteínas ocupam na rede e a função com o qual determinado cluster está envolvido. Santos et al. (2021) demonstram que a análise da posição de uma proteína em uma rede PPI pode revelar suas funções biológicas e interações com outras proteínas envolvidas em processos celulares e biológicos específicos. Além disso, o uso de análises de centralidade de rede pode identificar proteínas-chave que funcionam como *hub*, *bottleneck* ou *hub-bottleneck* na rede PPI, o que pode fornecer informações adicionais sobre as funções biológicas de proteínas específicas (BARABASI e OLTVAI, 2004; WU et al., 2019).

Na rede contendo as proteínas *up* reguladas e exclusivamente expressas da variedade suscetível, temos às proteínas superoxide dismutase [Fe], isoform X3, identificadas como HB, pertencentes ao cluster 1, e que ligam o cluster 1 ao cluster 3; a glutathione S-transferase DHAR3, também identificada como (HB) pertencente ao cluster 1; a proteína 60S acidic ribosomal protein P0 também (HB) pertencente ao cluster 2, a qual liga o cluster 2 ao cluster 3; e finalmente a ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1, que é uma (HB) pertencente ao cluster 1, ligando o cluster 1 ao cluster 3.

A rede contendo as proteínas *down* reguladas utilizadas como *input* da variedade suscetível, encontra-se a: 17.3 kDa class II heat shock protein-like que é uma proteína do tipo B pertencente ao cluster 3, a ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1, identificada como sendo do tipo (HB) pertencente ao cluster 2, a qual liga o cluster 2 ao cluster 1, e a L-ascorbate peroxidase, isoform X2 que é uma proteína C pertencente ao cluster 4.

Para a variedade resistente, na rede contendo as proteínas *up* reguladas encontram-se a: phosphoglycerate kinase, a qual é uma proteína do tipo (HB) pertencente ao cluster 2, unindo o cluster 2 ao cluster 5; a actin-7 que é do tipo (HB) pertencente ao cluster 3; e a 17.3 kDa class II heat shock protein-like que é uma proteína (B) pertencente ao cluster 3. Na rede contendo as proteínas *down* reguladas, encontram-se: cysteine synthase-like a qual é uma proteína (C) pertencente ao cluster 2, a ferredoxin--NADP reductase, leaf-type isozyme, que é uma (HB) pertencente ao cluster 2 e a carbonic anhydrase 2-like isoform X1 a qual é uma proteína (C) pertencente ao cluster 3.

Em ambas as variedades foi possível a identificação de proteínas chaves, sendo elas H, B ou HB. A identificação dessas proteínas tem grande importância para o entendimento do funcionamento de vias metabólicas em que essas proteínas estão presentes. Estudos como o de Wu et al. (2019) demonstram que as interações entre as proteínas podem ser mapeadas para identificar proteínas que funcionam como (H) ou alvos preferenciais de outras proteínas. A análise de redes PPI também pode ajudar a identificar conjuntos de proteínas envolvidas em funções celulares específicas, ou que são co-reguladas, enquanto a integração de dados de expressão gênica pode fornecer informações valiosas sobre as vias celulares reguladas pelas proteínas. Além disso, a análise da conectividade das proteínas na rede PPI pode ajudar a entender os mecanismos subjacentes ao aumento ou diminuição do acúmulo de proteínas em um experimento.

Para cada cluster observado nas redes obtidas foi realizada a análise de ontologia gênica, e foi possível a obtenção e análise de processos biológicos nos quais os clusters estão envolvidos. No cluster 1 da rede obtida através das proteínas *up* reguladas da variedade suscetível, foi observado o processo biológico associado à via metabólica de resposta a toxinas. Outro exemplo foi o cluster 4 da rede obtida através das proteínas *down* reguladas também da variedade suscetível, que apresentou os processos associados ao metabolismo de oxigênio, espécies reativas de oxigênio e resposta ao estresse oxidativo. Bem como e o cluster 3 desta mesma rede, associado às vias metabólicas relacionadas à resposta ao calor e à resposta ao peróxido de hidrogênio. Para as redes utilizando as proteínas da variedade resistente foi observado que o cluster 5 da rede contendo as proteínas *up* está associado ao processo metabólico de superóxido, enquanto o cluster 3 está associado a resposta ao calor. Na rede contendo as proteínas *down* reguladas, o cluster 1 está relacionado ao processo metabólico da toxina, e o cluster 2 a geração de metabólitos precursores e energia.

A separação das redes obtidas em clusters, além da identificação dos processos metabólicos dos clusters e a função das proteínas que o compõem, bem como das proteínas obtidas no experimento prévio, auxiliam na compreensão do papel metabólico que os clusters presentes nas redes desempenham. A exemplo temos a proteína 17.3 kDa class II heat shock protein-like também conhecida como HSP17.3 que foi encontrada nas duas variedades, porém esta proteína na variedade suscetível esteve presente no cluster 3 e foi *down* regulada, enquanto que, para a variedade resistente também foi encontrada no cluster 3, porém foi *up* regulada. Esse resultado encontrado é um exemplo de como essas análises envolvendo redes pode ajudar na compreensão do metabolismo da planta em relação a interação planta-patógeno, visto que a proteína HSP17.3 está envolvida em vias metabólicas relacionada a defesa contra infecção de fitopatógenos, além do que, saber em qual cluster a proteína está inserida, a relação que o cluster tem com determinado processo metabólico e qual relação sua proteína obtida tem com as proteínas adjacentes dentro ou até mesmo fora do cluster podem ajudar a identificar novas proteínas relacionadas com o tema do objeto de estudo.

5. CONCLUSÃO

As proteínas obtidas nos diferentes tratamentos apresentaram níveis de acúmulo variáveis a depender do tratamento. Dentre essas, algumas foram identificadas como responsáveis pela defesa da planta. Deste modo, com o fato dessas descobertas, alinhada ao estudo de redes foi possível a identificação de clusters de proteínas associadas a determinada função exercida pelo cluster, o que abre o leque de informação de possíveis proteínas ou vias metabólicas como por exemplo processos metabólicos de pequenas moléculas, processos metabólicos de co-enzimas, processo metabólico de superóxido e processos metabólicos da glutationa a serem estudadas. Todo esse conhecimento gerado tem papel importante no melhor entendimento de funcionamento da defesa do gênero citrus contra o fitopatógeno *Phytophthora* spp.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. Plant Pathology. London: Elsier, 2005.

AMARO, G. C.; FIDELIS, E. G.; MEDEIROS, C. M.; SILVA, R. S. Risco econômico potencial do ácaro-hindustânico-do-citros (*Schizotetranychus hindustanicus* Hirst) para produção de citros no Brasil. Comunicado Técnico Embrapa. 10 p, 2021.

ANDRADE SILVA, E.M.; REIS, S.P.M.; ARGOLO, C.S.; GOMES, D.S.; BARBOSA, C.S.; GRAMACHO, K.P.; RIBEIRO, L.F.; SILVA, R.J.S.; MICHELI, F. *Moniliophthora perniciosa* development: key genes involved in stress-mediated cell wall organization and autophagy. International Journal Of Biological Macromolecules. v. 154, p. 1022-1035, 2020.

ATTARD, A.; EVANGELISTI, E.; KEBDANI-MINET, N.; PANABIERES, F.; DELEURY, E.; MAGGIO, C.; PONCHET, M.; GOURGES, M. Transcriptome dynamics of Arabidopsis thaliana root penetration by the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. BMC Genomics v. 15, n. 1, p. 538, 2014.

BARABASI, A.L.; OLTVAI, Z.N. Network biology: understanding the cell's functional organization. Nature reviews. v. 5, p.101-113, 2004

BASTOS, D.C.; SOMBRA, K.E.S.; LOUREIRO, F.L.C.; SILVA, A.C.C.; PASSOS, O.S. Initial development of Tahiti acid lime trees on different rootstocks in the semiarid region of Ceará, Brazi. Citrus Research & Technology. v. 38, n. 1, 2017.

BOEVINK, P.C.; BIRCH, P.R.J.; TURNBULL, D.; WHISSON, S.C. Devastating intimacy: the cell biology of plant *phytophthora interactions*. New Phytologist. v. 228, n. 2, p. 445-458, 2020.

BRAUN, P.; AUBOURG, S.; LEENE, J.V.; JAEGER, G.; LURIN, C. Plant protein interactomes. Annual Review of Plant Biology. v. 64, p.161-187, 2013.

CANTALAPIEDRA, C.P.; HERNÁNDEZ-PLAZA, A.; LETUNIC, I.; BORK, P.; HUERTA-CEPAS, J. EggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale. Molecular Biology And Evolution. v. 38, n. 12, p. 5825-5829, 2021.

CAO, L.; WANG, W.; ZHANG, W.; STAIGER, C.J. Lipid Signaling Requires ROS Production to Elicit Actin Cytoskeleton Remodeling during Plant Innate Immunity. Interative Journal Molecular Science. v. 23, 2021.

COSMO, B.M.N.; GALERIANI, T.M. Pragas dos citros: cochonilhas, pulgões, minador dos citros, cigarrinhas, bicho furão e mosca branca dos citros. Revista Agronomia Brasileira. v. 4, p.1-9, 2020.

ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. Phytophthora diseases worldwide. St. Paul: The Americam Phytopathological Society, 1996.

FEICHETNBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JUNIOR, J. Doenças dos citros. Manual de fitopatologia - doenças das plantas cultivadas, v.2, p.239-269, 2005.

GARAVAGLIA, B.S.; THOMAS, L.; GOTTING, N.; DUNGER, G.; GAROFALO, C.G. A Eukaryotic-Acquired Gene by a Biotrophic Phytopathogen Allows Prolonged Survival on the Host by Counteracting the Shut-Down of Plant Photosynthesis. Plos One. v. 5, n. 1, 2010.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review of Phytopathology. v. 43, p. 205-227, 2005.

GUISSONI, A.C.P.; CARDOSO, D.D.P. Proteômica: Uma ferramenta analítica. Revista Eletrônica de Ciências Humanas, Saúde e Tecnologia. v. 8, n. 1, p. 68-81, 2019.

HE. Y.; GUO, W.; PENG, J.; GUO, J.; MA, J.; WANG, X.; ZHANG, C.; JIA, N.; WANG, E.; HU, D.; WANG, Z. Volatile Organic Compounds of Streptomyces sp. TOR3209 Stimulated Tobacco Growth by Up-Regulating the Expression of Genes Related to Plant Growth and Development. Front Microbiolical. v. 20, n.13, 2022.

LESSA, I.Z.V.; LUZ, E.D.M.N.; MAGALHÃES, D.M.A.; BEZERRA, J.L.; PIRES, J.L. Morfologia e agressividade de isolados de *Phytophthora palmivora* de cacaueiro no estado da Bahia. v. 46, n.3, p. 228-235, 2020.

LI, L.; ZHANG, S.; LIU, X.; YU, R.; LI, X.; LIU, M.; ZHANG, H.; ZHENG, X.; WANG, P.; ZHANG, Z. Magnaporthe oryzae Abp1, a MoArk1 Kinase-Interacting Actin Binding Protein, Links Actin Cytoskeleton Regulation to Growth, Endocytosis, and Pathogenesis. Molecular Plant-Microbe Interactions. v. 32, n. 4, p. 437-451, 2019.

MERING, C. V. STRING: a database of predicted functional associations between proteins. Nucleic Acids Research. v. 31, n. 1, p. 258-261, 2003.

MITTLER, R.; VANDERAWERA, S.; GOLLERY, M.; BREUSEGEM, F.V. Reactive Oxigen gene network of plants. Trends in Plants Science. v. 9, n.10, p. 490-498, 2004.

NAJAMI, N.; JANDA, T.; BARRIAH, W.; KAYAM, G.; TAL, M.; GUY, M.; VOLOKITA, M. Ascorbate peroxidase gene family in tomato: its identification and characterization. Molecular Genetics And Genomics. v. 279, n. 2, p. 171-182, 2008.

NEVES, M.F. O retrato da citricultura brasileira. Markerstrat. Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing Estratégica. 137p. 2010.

PERRINE-WALKER, F. *Phytophthora palmivora–Cocoa* Interaction. Journal of Fungi. v. 6, n.67, p. 1-20, 2020.

REZENDE, D.C.; BRANDÃO, D.F.R.; BRAND, S.C.; BLUMER, S.; PASCHOLATI, S.F.; MAFRA, N.M. Management of gummosis in citrus with potassium phosphite. Research, Society and Development, v. 9, n. 10, p. 1-21, 2020.

ROCHA, T.L.; COSTA, P.H.A.; MAGALHÃES, J.C.C.; EVARISTO, R.G.S.; VASCONCELOS, E.A.R.; COUTINHO, M.V.C.; PAES, N.S. Eletroforese bidimensional e analise de proteomas. Comunicado Técnico, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. v. 136, p.1-12, 2005.

SANTOS, A.S.; ANDRADE, E.M.; SOUSA, A.R.O.; COSTA, M.M.C.; TOGAWA, R.; GRYNBERG, P.; PIROVANI, C.P.; OLIVEIRA, S.A.S.; SOARES FILHO, W.S.; COELHO FILHO, M.A. Transcriptome profile of drought responsive candidate genes in varieties of citrus rootstocks with different tolerance strategies. Scientia Horticulturae. v. 277, p. 109838, 2021.

SANTOS, E.C.; PIROVANI, C.P.; CORREA, S.C.; MICHELI, F.; GRAMACHO, K.P. O patógeno *Moniliophthora perniciosa* promove modulação proteômica diferencial de genótipos de cacau com resistência contrastante à vassoura-de-bruxa. BMC Plant biology. v. 20, n.1, 2020.

SCHARTE, J.; SCHON, S.; WEIS, E. Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with Phytophthora nicotianae. Plant, cell & Environment. v. 28, p. 1421-1435, 2005.

TIMMER, L.W.; MENGE, J.A. *Phytophthora* induced diseases in: TIMMER, L.W.; GARNSEY, J.S.M.; GRAHAM, H. Compendium of citrus diseases. Sant Paul: APS Press, 80 p, 1993.

TÖRÖNEN, P.; HOLM, L. PANNZER: A practical tool for protein function prediction. Protein Science. v. 31, n. 1, p. 118-128, 2021.

WOJCIK-JAGLA M.; RAPACZ, M.; DUBAS, E.; KRZEWSKA, M.; KOPEC, P.; NOWICKA, A.; OSTROWSKA, A.; MALAGA, S.; ŻUR, I. Candidate Genes for Freezing and Drought Tolerance Selected on the Basis of Proteome Analysis in Doubled Haploid Lines of Barley. International Journal Molecular Science. v. 17, n. 21, 2020

WU, L.; HAN, Z.; WANG, S.; WANG, X.; SUN, A.; ZU, X.; CHEN, Y. Comparative proteomic analysis of the plant-virus interaction in resistant and susceptible ecotypes of maize infected with sugarcane mosaic virus. Journal of Proteomics. v. 89, p. 124-40, 2013.

WU, X.; PENG, L; ZHANG, Y.; CHEN, S.; LEI, Q.; LI, G.; ZHANG, C. Identification of Key Genes and Pathways in Cervical Cancer by Bioinformatics Analysis. International Journal Of Medical Sciences. v. 16, n. 6, p. 800-812, 2019.

ZHANG, Z.; PEI, X.; ZHANG, R.; LU, Y.; ZHENG, J.; ZHENG, Y. Molecular characterization and expression analysis of small heat shock protein 17.3 gene from Sorbus pohuashanensis (Hance) Hedl. in response to abiotic stress. Molecular Biology Reports. v. 47, n. 12, p. 9325-9335, 2020.

CAPÍTULO 2:

Modelagem de proteínas de inibidores de protease de citros e proteases do oomiceto *Phytophthora* spp.: uma abordagem computacional para compreender a interação planta-patógeno.

RESUMO

Os inibidores de protease atuam suprimindo a atuação das enzimas proteolíticas de microrganismos fitopatogênicos, constituindo, um importante mecanismo de defesa das plantas contra infecções, podendo ser induzidos mediante ao ataque de um patógeno ou insetos. Compreender a estrutura e modo de ação destas proteínas pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias eficientes para controle biológico contra fitopatógenos. A utilização da modelagem das proteínas de interesse e da ferramenta *docking* molecular em estudos de interação planta-patógeno em culturas de interesse comercial é interessante para compreender como um determinado inibidor de protease interage com uma protease produzida pelo patógeno, possibilitando a identificação e posterior seleção dos inibidores mais eficientes para controle biológico. Deste modo, o objetivo deste estudo foi realizar a modelagem de proteases do oomiceto *Phytophthora* sp. e de inibidores de protease de citros a partir de ortólogos de *Theobroma cacao*. Foi realizada a recuperação em banco de dados dos inibidores de protease em cacau e dos seus correspondentes em diferentes genomas de citrus, seis sequências de proteases (não redundantes) foram obtidas a partir de estudos anteriores utilizando espécies de *Phytophthora* spp. Após a retirada dos peptídeos sinais das sequências recuperadas, foi realizado o alinhamento das mesmas, utilizando a ferramenta clustal para triagem e escolha de algumas sequências para serem modeladas. A modelagem das proteínas para obtenção do possível modelo 3D foi realizada utilizando dois programas computacionais: o AlphaFold2 e o I-TASSER. Das 133 sequências de inibidores de proteases obtidas por ortologia, foram eliminadas 37 sequências redundantes; das 96 sequências restantes 27 continham peptídeos sinais que foram eliminados das sequências. Em relação às sequências de proteases, somente duas delas continham um peptídeo sinal que foi retirado das sequências previamente às análises de modelagem. Foi constatado a formação de pequenos subgrupos dentro do alinhamento das sequências de inibidores de protease, e existência de duas áreas mais altamente conservadas e uma outra área menos conservada. A modelagem de inibidores de protease obtida através do AlphaFold não possibilitou a obtenção de modelos muito satisfatórios devido a própria estrutura das proteínas. Para as sequências de proteases, três sequências apresentaram uma boa conformação 3D, enquanto que para as demais sequências o resultado obtido foi insatisfatório, não possibilitando a realização de *docking* molecular.

Palavras-chave: *Phytophthora*; citricultura; inibidores de proteases

ABSTRACT

Protease inhibitors act by suppressing the action of proteolytic enzymes of phytopathogenic microorganisms, constituting an important plant defense mechanism against infections, which can be induced by attack by a pathogen or insects. Understanding the structure and mode of action of these proteins can help in the development of efficient strategies for biological control against phytopathogens. The use of protein modeling of interest and the molecular docking tool in studies of plant-pathogen interaction in cultures of commercial interest is interesting to understand how a certain protease inhibitor interacts with a protease produced by the pathogen, enabling the identification and subsequent selection of the more efficient inhibitors for biological control. Thus, the aim of this study was to model the proteases of the oomycete *Phytophthora* sp. and citrus protease inhibitors from *Theobroma cacao* orthologs. Database retrieval of protease inhibitors in cocoa and their counterparts in different citrus genomes was carried out, six protease sequences (non-redundant) were obtained from previous studies using species of *Phytophthora* spp. After removing the signal peptides from the recovered sequences, they were aligned using the clustal tool for sorting and choosing some sequences to be modeled. Protein modeling to obtain a possible 3D model was performed using two computer programs: AlphaFold2 and I-TASSER. Of the 133 protease inhibitor sequences obtained by orthology, 37 redundant sequences were eliminated; of the remaining 96 sequences 27 contained signal peptides that were deleted from the sequences. Regarding the protease sequences, only two of them contained a signal peptide that was removed from the sequences prior to the modeling analyses. The formation of small subgroups was observed within the alignment of the protease inhibitor sequences, and the existence of two more highly conserved areas and another less conserved area. The modeling of protease inhibitors obtained through AlphaFold did not make it possible to obtain very satisfactory models due to the very structure of the proteins. For the protease sequences, three sequences showed a good 3D conformation, while for the other sequences the result obtained was unsatisfactory, not allowing molecular docking.

Keywords: *Phytophthora*; citriculture; protease inhibitors

1. INTRODUÇÃO

Os inibidores de protease constituem um importante mecanismo de defesa das plantas contra infecções, pois atuam suprimindo a atuação das enzimas proteolíticas de microrganismos fitopatogênicos (TREMACOLDI, 2009; CHÁVEZ et al. 2020), as quais podem hidrolisar as proteínas da membrana e da parede celular de plantas hospedeiras facilitando a penetração e infecção (TREMACOLDI, 2009). Diversos estudos têm sido realizados utilizando inibidores de protease para o combate a fitopatógenos em culturas economicamente importantes, a exemplo o basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, causador da vassoura de bruxa no cacaueiro e o oomiceto *Phytophthora*, causador da gomose da *Phytophthora* em citros *(*JASHNI et al., 2015). Tais pesquisas têm contribuído significativamente para o desenvolvimento do setor agrícola. (DAMINELLI et al., 2010; MOTA et al., 2010; SILVA et al., 2018).

Uma vez que os inibidores de proteases são importantes para a defesa da planta contra os fitopatógenos, compreender a estrutura e também a função destas proteínas pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias eficientes para controle biológico contra fitopatógenos (MOTA et al., 2010; CHÁVEZ et al., 2020), além de apresentar baixa toxicidade ao homem e menor impacto ambiental, sendo uma alternativa ao uso de agroquímicos e defensivos agrícolas (TREMACOLDI, 2009).

A biologia estrutural é uma área interdisciplinar, que combina princípios da biologia, química e física para investigar a organização das moléculas biológicas em formato tridimensional, e compreender como a estrutura molecular influencia as propriedades e atividades biológicas, bem como, sua relação com a função e o comportamento dos sistemas vivos (FERNANDEZ-LEIRO e SCHERES, 2016;). Diversas técnicas podem ser utilizadas para estudos de biologia estrutural, tais como a cristalografia de raios X, ressonância magnética nuclear (RMN) e microscopia eletrônica, que permitem a determinação da estrutura tridimensional de macromoléculas (FERNANDEZ-LEIRO e SCHERES, 2016; MASRATI et al., 2021; ZHU et al., 2021). Essas técnicas têm sido aplicadas no estudo de proteínas, ácidos nucléicos e outras macromoléculas, revelando detalhes precisos da sua organização espacial e auxiliando na compreensão de seus mecanismos de funcionamento (ZHU et al., 2021).

O uso de ferramentas de bioinformática em estudos na área da biologia estrutural permite uma abordagem computacional para a análise e modelagem de estruturas moleculares, ampliando as capacidades de estudos estruturais (KUHLMAN e BRADLEY, 2019). Uma das

aplicações da bioinformática na biologia estrutural é a previsão de estruturas tridimensionais de proteínas a partir de sequências de aminoácidos. Métodos baseados em modelagem computacional, como a modelagem por homologia e uso de inteligências artificiais, permitem inferir a estrutura de proteínas com base em estruturas conhecidas e relacionadas (CRAMER, 2021; JUMPER et al., 2021). Essas técnicas têm sido aprimoradas e refinadas ao longo dos anos, contribuindo para uma melhor compreensão da estrutura e função de proteínas de interesse biológico (ZHANG, 2007; ZHANG, 2014; YANG et al., 2015).

A integração de dados estruturais com informações genômicas, proteômicas e funcionais permite a identificação de relações estrutura-função em nível de sistemas biológicos (SILLIOTE et al., 2021). A análise bioinformática desses dados em grande escala também facilita a identificação de sítios de ligação de pequenas moléculas, resíduos críticos e interações moleculares relevantes. No campo da biologia estrutural, a bioinformática tem sido fundamental no desenvolvimento de bancos de dados e recursos online que abrigam informações estruturais e funcionais de proteínas (BURLEY et al., 2019). Esses recursos, como o Protein Data Bank (PDB) e o UniProt, fornecem acesso a uma vasta quantidade de estruturas moleculares e dados associados, permitindo a realização de análises comparativas, estudos de evolução e modelagem de interações proteína-ligante (ZHU et al., 2021; UNIPROT CONSORTIUM, 2021; BURLEY et al., 2021; BURLEY et al., 2022).

A técnica de *docking* molecular, também conhecida como ancoragem molecular é uma abordagem que realiza a predição da melhor posição e orientação na interação entre proteínas e é realizada com base na modelagem das proteínas de interesse (FAN et al., 2019). A utilização da modelagem tridimensional das proteínas de interesse e do *docking* molecular em estudos de interação planta-patógeno em culturas de interesse comercial é interessante para compreender como um determinado inibidor de protease interage com uma protease produzida pelo patógeno. Esta abordagem, possibilita a identificação e seleção dos inibidores mais eficientes para controle biológico, bem como desenvolvimento de inibidores de protease sintéticos a partir de compostos que imitam as características estruturais de inibidores de proteases natural (BARROS et al., 2010; MOTA et al., 2010; CHÁVEZ et al., 2020).

Deste modo, o objetivo deste estudo é modelar *in-silico* proteases do oomiceto *Phytophthora* spp e inibidores de proteases em *Citrus sinensis*, a partir de sequências ortologas de *Theobroma cacao*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Recuperação em banco de dados e alinhamento de sequências

Foram utilizados inibidores de proteases oriundos de cacaueiro (*Theobroma cacao*), obtidos em estudos prévios, para análise de domínios no *software* InterProScan (JONES et al., 2014). Em seguida foi obtido o código referente a família de proteínas em estudo (código IPR). Foi realizada uma busca com base no código obtido (IPR036354) em anotação de genomas de espécies de Citrus (Dados do grupo de pesquisa), das quais, foram resgatadas as sequências no formato FASTA das sequências correspondentes.

As sequências de proteases foram obtidas a partir de estudos anteriores utilizando espécies de *Phytophthora* sp sendo obtidas seis proteases. Em seguida, foi realizada a análise das sequências para a retirada de sequências redundantes através do programa jalview (PROCTER et al., 2021) dos inibidores de protease de citros e das proteases de *Phytophthora* sp. Posteriormente, foi feita a avaliação para a identificação de presença de peptídeo sinal utilizando o *signal* p (versão 0.5) (ARMENTEROS et al., 2019) em ambos os grupos, os quais foram retirados quando presentes. As sequências sem peptídeos sinal foram alinhadas utilizando a ferramenta clustal.

No alinhamento das sequências de inibidores de proteases, houve a formação de grupos, nos quais foram selecionadas para modelagem uma sequência amostral para cada grupo formado. Já para as sequências de protease de *Phytophthora* sp, todas as sequências foram selecionadas para posterior modelagem devido ao pequeno número de sequências disponíveis.

3.2 Modelagem

A modelagem das proteínas de interesse foi realizada utilizando dois programas computacionais: o AlphaFold2 que é uma ferramenta de modelagem de proteínas que utiliza redes neurais profundas (*deep learning*) para prever a estrutura tridimensional de proteínas a partir de sua sequência de aminoácidos. utilizando aprendizado de máquina, a partir de um conjunto de dados de proteínas com estruturas conhecidas (JUMPER et al., 2021) e o I-TASSER, o qual utiliza uma abordagem iterativa de refinamento no qual se baseia na comparação de sequências de aminoácidos da proteína logo depois ocorre a montagem da estrutura e depois o refinamento através simulação molecular e otimização de energia (ROY et

al., 2010), todas as sequências escolhidas foram utilizadas em ambas as ferramentas obtendo seu possível modelo 3D.

3. **RESULTADOS**

Foram obtidas 133 sequências FASTA de proteínas referente a inibidores de proteases de citros por ortologia. Após o alinhamento, foram eliminadas 37 sequências redundantes, utilizando a ferramenta jalview, das 96 sequências restantes, 27 sequências continham peptídeo sinal que foram eliminados das sequências. Para as sequências de proteases, das seis sequências obtidas não foi apresentado redundância entre elas, sendo retirado peptídeo sinal de duas sequências.

O alinhamento utilizando a ferramenta *Clustal* presente no Jalview permitiu a constatação da formação de pequenos subgrupos dentro do alinhamento das sequências de inibidores de protease. Também foi possível observar entre as sequências a existência de dois domínios mais conservados e outro domínio menos conservado (Figura 1 e 2).

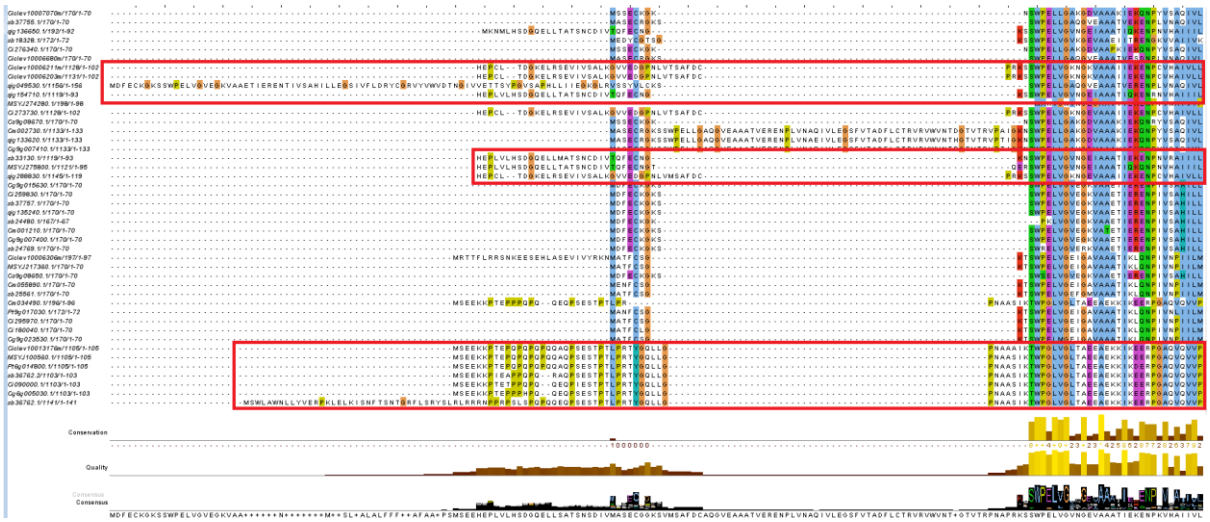

Figura 1. Destaque em vermelho indica a formação de grupos observados através do alinhamento das sequências de inibidores de protease de citros.

Figura 2. Alinhamento de sequências de inibidores de protease. Domínio menos conservado destacado em vermelho, domínios mais conservados estão destacados em preto.

Para as sequências das proteases não foi necessário realizar o alinhamento das sequências, devido ao baixo número de sequências e grande diferença entre elas, não sendo necessário a triagem para a escolha das sequências a serem modeladas para utilização em possível *docking* molecular.

A modelagem obtida através do AlphaFold utilizando uma sequência de cada grupo formado no alinhamento, não foi possível a obtenção de modelagens muito satisfatórias, visto que parte da sequência das proteínas de inibidores de proteases modeladas apresentaram nível de conformação *very low* (Figura 3).

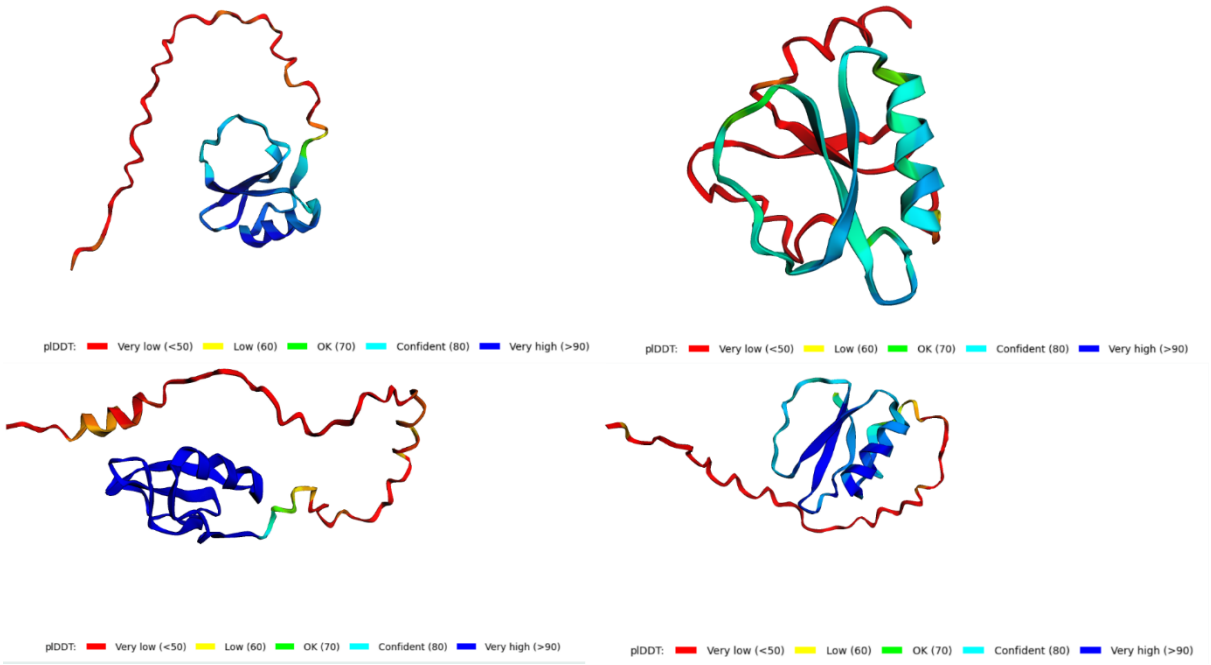

Figura 3. Tentativa de modelagem de algumas sequências de inibidores de protease de citros.

Para as sequências de proteases, três sequências apresentaram boa conformação 3D; enquanto que as demais sequências o resultado obtido foi insatisfatório, como demonstrado nas figuras 4 e 5.

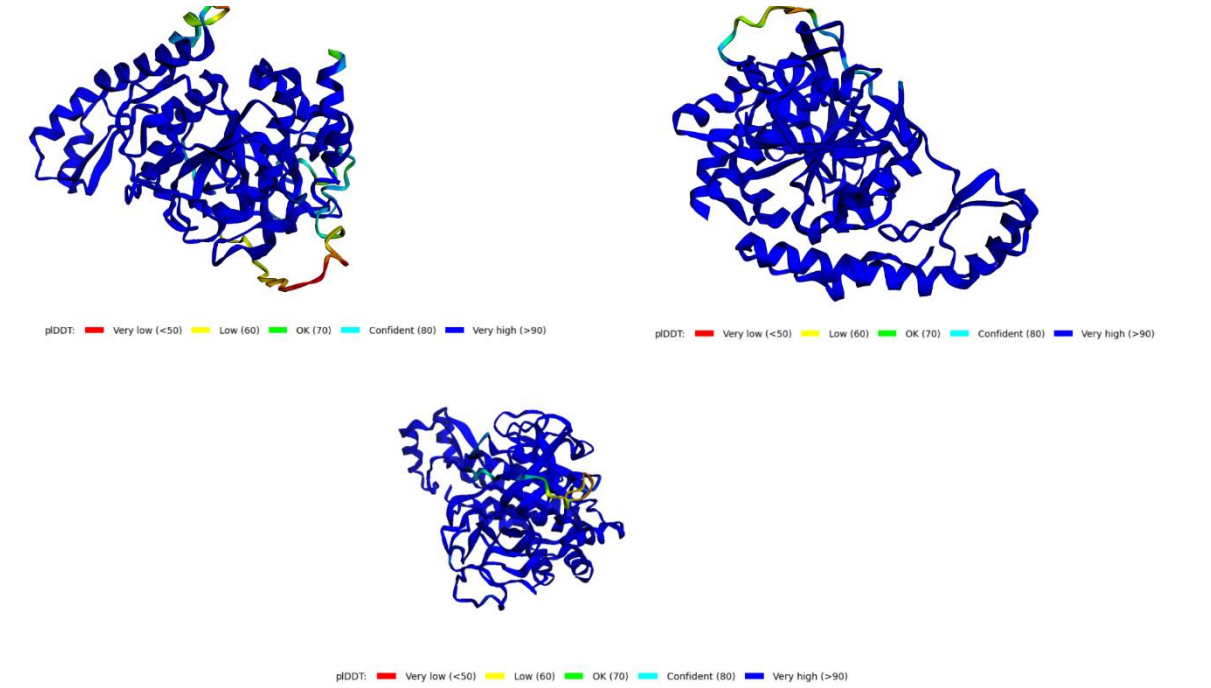

Figura 4. Modelagem protease de *Phytophthora* sp com conformação 3D satisfatória (confidente > 80%).

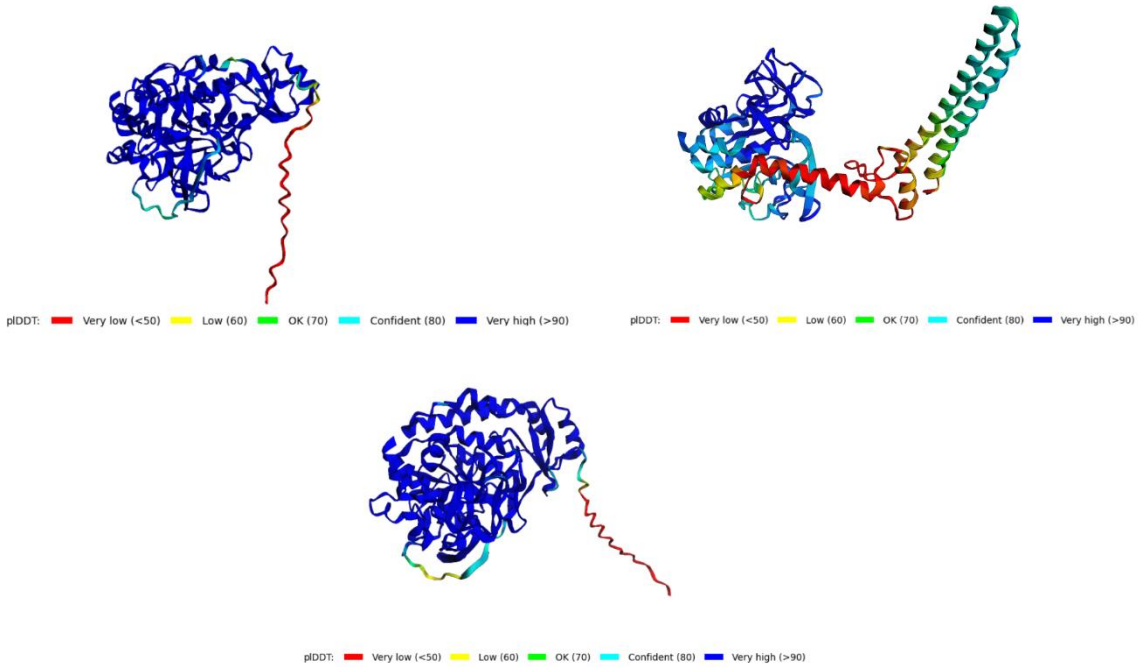

Figura 5. Modelagem protease de *Phytophthora* sp com conformação 3D insatisfatória (very low < 50%).

Devido à falta de modelos 3D dos inibidores de proteases com estrutura satisfatória, não foi possível realizar *docking* molecular utilizando os inibidores de proteases e as proteases modeladas.

4. DISCUSSÃO

As sequências de inibidores de proteases não obtiveram boa conformação, visto que, elas não tinham muitos representantes já modelados em banco de dados para a utilização de modelagem por homologia. Por esta razão, foram utilizadas as ferramentas AlphaFold e I-Tasser na tentativa da modelagem. No entanto, essas ferramentas também não foram suficientes para determinar a conformação total das proteínas. Uma das possíveis explicações pode estar relacionada ao fato de que é possível que as regiões não modeladas sejam IUPs (*Intrinsically Unstructured Proteins*), podendo dificultar a modelagem das proteínas, visto que as regiões com IUPs apresentam uma alta flexibilidade conformacional, podendo adotar diferentes conformações estruturais em função das interações com outras moléculas no ambiente celular (TOMPA e FUXREITER, 2007). Outra relação que pode ser feita, é a alta flexibilidade das regiões com IUPs, dificultando a previsão da sua estrutura tridimensional utilizando métodos de modelagem de proteínas, como a predição de estruturas por homologia ou o uso de ferramentas de *docking* molecular. Além disso, essas regiões podem apresentar características de desordem conformacional que tornam difícil a sua resolução por técnicas de cristalografia de raios-X ou espectroscopia de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) (GROMIHA et al., 2017).

Por outro lado, a dificuldade de modelagem devido aos possíveis IUPs presentes nas sequências dos inibidores de proteases são importantes para a função dos inibidores, pois essas regiões com IUPs são frequentemente responsáveis pela interação com a protease-alvo e podem apresentar diferentes conformações estruturais em função do tipo de protease e do ambiente celular, podendo ser útil em certas aplicações, como em interações proteína-proteína ou proteína-ácido nucleico, onde a alta flexibilidade conformacional pode permitir o reconhecimento e o ajuste fino das interações moleculares (LEE et al., 2014; GROMIHA et al., 2017).

A escolha para da ferramenta para a modelagem das proteínas foi o AlphaFold versão (ColabFold v1.5.2), visto que as tentativas de modelagem pelo AlphaFold obtiveram modelos melhores do que a ferramenta I-Tasser. Apesar da grande relevância da ferramenta I-Tasser, o AlphaFold vem demonstrando superioridade em relação às outras ferramentas de modelagem de proteínas, como ficou evidente na disputa vencida na CASP13, em 2018. Senior et al (2020) comentam que o AlphaFold foi treinado em um grande conjunto de dados de proteínas com estruturas conhecidas e foi capaz de prever a estrutura de muitas proteínas em níveis de precisão

comparáveis ou superiores aos experimentos de resolução de raios X e de crio-microscopia eletrônica. Como resultado, o AlphaFold tem o potencial de acelerar a pesquisa em várias áreas da biologia, incluindo o desenvolvimento de medicamentos e a compreensão de doenças (JUMPER et al., 2021)

O uso do da versão do AlphaFold colab talvez seja o responsável pela modelagem insatisfatória das proteínas, visto que, a versão online possui limitações no poder de processamento e quantidade de sequências presente no banco de dados, diferente da versão completa do AlphaFold, presente no servidor da própria ferramenta. É possível que a utilização da ferramenta completa possa sanar o problema relacionado à modelagem das proteínas possibilitando prosseguir com a pesquisa.

Uma alternativa viável para a resolução deste problema seria a utilização de técnicas de simulação em dinâmica molecular, essa técnica permite revelar os movimentos atômicos referentes a proteína em questão, sendo possível a obtenção de diversos modelos proteicos a depender das variáveis utilizadas na simulação dinâmica (HO e DILL, 2006).

Devido a grande quantidade de sequências para a modelagem, a utilização de árvores filogenéticas pode ser necessária para a discriminação e escolhas de sequências representantes de grupos específicos formados na árvore. Esta abordagem pode ser necessária, uma vez que, a modelagem de todas as sequências recuperadas pode se tornar inviável devido ao alto custo da sintetização do material a ser utilizado em pesquisas futuras.

5. CONCLUSÃO

As sequências obtidas para a modelagem apresentam desafios a serem superados. Devido às dificuldades já explanadas anteriormente, a utilização de árvores filogenéticas pode ser de grande ajuda na seleção das sequências a serem modeladas. Além disso, o possível uso do servidor com os dados completos do AlphaFold pode sanar a dificuldade encontrada na modelagem das proteínas, e possibilitar a utilização das proteínas em *docking* molecular, auxiliando em trabalhos futuros utilizando esses inibidores para o combate contra a *Phytophthora* spp.

REFERÊNCIAS

ARMENTEROS, J.J.A.; TSIRIGOS, K.D.; SØNDERBY, C.K.; PETERSEN, T.N.; WINTHER, O.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. Nature Biotechnology. v. 37, n. 4, p. 420-423, 2019.

BARROS, F.C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L.C.C.; JULIATTI, F.C. Indução de resistência de plantas contra fitopatógenos. Bioscience Journal. v. 26, n.2, p. 231-239, 2010.

BURLEY, S.K.; BHIKADIYA C.; Bi, C.; BITTRICH, S.; CHAO, H.; CHEN, L.; CRAIG, P.A.; CRICHLOW G.V.; DALENBERG, K.; DUARTE, J.M.; DUTTA, S.; FAYAZI, M.; FENG, Z.; FLATT, J.W.; GANESAN, S.J.; GHOSH, S.; GOODSELL, D.S.; GREEN, R.K.; GURANOVIC V.; HENRY, J.; HUDSON, B.P.; KHOKHRIAKOV, I.; LAWSON, C.L.; LIANG, Y., LOWE, R.; PEISACH, E.; PERSIKOVA, I.; PIEHL, D.W.; ROSE, Y.; SALI, A.; SEGURA, J.; SEKHARAN, M.; SHAO, C.; VALLAT, B.; VOIGT, M.; WEBB, B.; WESTBROOK, J.D. WHETSTONE, S.; YOUNG, J.Y.; ZALESVSKY, A.; ZARDECKI, C. RCSB Protein Data bank: Tools for visualizing and understanding biological macromolecules in 3D. Protein Science. v. 31, n.12, 2022.

BURLEY, S.K.; BHIKADIYA, C.; BI, C.; BITTRICH, S.; CHEN, Li; CRICHLOW, G.V.; CHRISTIE, C.H.; DALENBERG, K.; COSTANZO, L.; DUARTE, J.M. RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3d structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. Nucleic Acids Research. v. 49, n. 1, p. 437-451, 2021.

BURLEY, S.K; BERMAN, H.M; BHIKADIYA, C.; BI, C.; CHEN, L.; DICOSTANZO, L.; CHRISTIE, C.; DALENBERG, K.; DUARTE, J.M; DUTTA, S. RCSB Protein Data Bank: biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy. Nucleic Acids Research. v. 47, n. 1, p. 464-474, 2019.

CHÁVEZ, C.Y.L.; CORDEIRO, G.; SILVA, C.R.; SILVA, C.R.; CAMPOS, W.G.; OLIVEIRA, M.G.A. Efeito de inibidores de proteases na atividade enzimática de *Coccus viridis* em *Coffea arabica.* Revista de Ciências Agrárias. v. 63, p. 1-7, 2019.

COTABARREN, J.; LUFRANO, D.; PARISI, M.G.; OBREGÓN, W.D. Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. Plant science. v. 292, p. 1-24, 2020.

CRAMER, P. AlphaFold2 and the future of structural biology. Nature Structural & Molecular Biology. v. 28, n. 9, p. 704-705, 2021.

DAMINELLI, E.N.; TRITINGER, A.; SPADA, C. Alterações hematológicas em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficência humana submetidos à terapia antirretroviral com e sem inibidor de protease. Revista Brasileira de Hematologia. v. 32, n. 1, p. 10- 15, 2010.

FAN, J.; FU, A.; ZHANG, L. Progress in molecular docking. Quantitative biology. v. 7, n.2, p. 83-89, 2019.

FERNADEZ-LEIRO, R., SCHERES, S. Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy. Nature. v. 537, p. 339–346, 2016.

GROMIHA, M.M.; YUGANDHAR, K.; JEMIMAH, S. Protein–protein interactions: scoring schemes and binding affinity. Current Opinion In Structural Biology. v. 44, p. 31-38, 2017.

HO, B.K.; DILL, K.A. Folding Very Short Peptides Using Molecular Dynamics. Plos Computacional Biology. v. 2, n. 5, p. 476- 477, 2006.

JASHNI, M.K.; MEHRABI, R.; COLLEMARE, J.; MESARICH, C.H.; WIT, P.J.G.M. The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant–pathogen interactions. Frontiers in plant science. v. 6, n. 584, p. 1-7, 2015.

JONES, P.; BINNS, D.; CHANG, H.; FRASER, M.; LI, W.; MCANULLA, C.; MCWILLIAM, H.; MASLEN, J.; MITCHELL, A.; NUKA, G. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. Bioinformatics. v. 30, n. 9, p. 1236-1240, 2014.

JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A.; GREEN, T.; FIGURNOV, M.; RONNEBERGER, O.; TUNYASUVUNAKOOL, K.; BATES, R.; SÍDEK, A.; POTAPENKO, A. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature. v. 596, n. 7873, p. 583-589, 2021.

KUHLMAN, B.; BRADLEY, P. Advances in protein structure prediction and design. Nature reviews molecular cell biology. v. 20, p. 681-697, 2019.

LEE, R.V.D.; BULJAN, M.; LANG, B.; WEATHERITT, R.J.; DAUGHDRILL, G.W.; DUNKER, A.K.; FUXREITER, M.; GOUGH, J.; GSPONER, J.; JONES, D.T. Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. Chemical Reviews. v. 114, n. 13, p. 6589-6631, 2014.

MASRATI, G.; LANDAU, M.; BEN-TAL, N.; LUPAS, A.; KOSLOFF, M.; KOSINSKI, J. Integrative structural biology in the era of accurate structure prediction. Journal of Molecular Biology. v. 433, n. 20, p. 16-27, 2021.

MOTA, S.G.R.; BARROS, T.F.; CASTILHO, M.S. In vitro Screening and Chemometrics Analysis on a Series of Azole Derivatives with Fungicide Activity Against *Moniliophthora perniciosa*. Journal of the Brazilian Chemical Society. v. 21, n. 3, p. 510-519, 2010.

PROCTER, J.B.; CARSTAIRS, G.M.; SOARES, B.; MOURÃO, K.; OFOEGBU, T. C.; BARTON, D.; LUI, L.; MENARD, A.; SHERSTNEV, N.; ROLDAN-MARTINEZ, D. Alignment of Biological Sequences with Jalview. Methods In Molecular Biology. v. 2231, p. 203-224, 2020.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-Tasser: a unified platform for automated protein structure and function prediction. v. 5, n.4, p. 725-738, 2010.

SENIOR, A.W.; EVANS, R.; JUMPER, J.; KIRKPATRICK, J.; SIFRE, L.; GREEN, T.; QIN, C.; SÍDEK, A.; NELSON, A.W.R.; BRIDGLAND, A. Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. Nature. v. 577, n. 7792, p. 706-710, 2020.

SILLITOE, I.; BORDIN, N.; DAWSON, N.; WAMAN, V.P; ASHFORD, P.; SCHOLES, H. M; PANG, C.M.; WOODRIDGE, L.; RAUER, C.; SEN, N. CATH: increased structural coverage of functional space. Nucleic Acids Research. v. 49, n. 1, p. 266-273, 2021.

SILVA, J.; MARINHO, M.M.; SILVA, J.E.; MARINHO, E.M.; MARINHO, E.S. Estudo comparativo de docking molecular entre o inibidor de protease saquinavir e o carotenoide bixina como potencial inibidor do vírus HIV tipo I (1HXB). Revista Expressão Católica Saúde. v.3, n.1, 2018.

TOMPA, P.; FUXREITER, M. Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein-protein interactions. Trend in Biochemical Sciences. v.33, n.1, 2007.

TREMACOLDI, C.R. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. 1 ed. Belém, 44 p., 2009.

UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. Nuclei Acids Research. v. 49, p. 480-489, 2021.

YANG, J.; ZHANG, W.; HE, B.; WALKER, S.E.; ZHANG, H.; GOVINDARAJOO, B.; VIRTANEN, J.; XUE, Z.; SHEN, H.B.; ZHANG, Y. Template-based protein structure prediction in CASP11 and retrospect of I-TASSER in the last decade. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. v. 84, p. 233-246, 2015.

ZHANG, Y. Interplay of I-TASSER and QUARK for template-based and ab initio protein structure prediction in CASP10. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. v. 82, p. 175-187, 2014.

ZHANG, Y. Template-based modeling and free modeling by I-TASSER in CASP7. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics., v. 69, n. 8, p. 108-117, 2007.

ZHU, L.; DAVARI, M. D.; LI, W. Recent Advances in the Prediction of Protein Structural Classes: feature descriptors and machine learning algorithms. Crystals. v. 11, n. 4, p. 324, 2021.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho integrou análises de proteínas *up* e *down* reguladas, redes de interação PPI e estudos de biologia estrutural para melhor compreender os mecanismos moleculares relacionados à regulação e defesa das plantas de citrus. Os resultados obtidos contribuem para o avanço do conhecimento na área e podem ser úteis no desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle de doenças causadas por *Phytophthora* em citrus.

No entanto, é importante ressaltar que esse é um campo de pesquisa em constante evolução, e ainda há muito a ser explorado. Futuros estudos podem se concentrar na validação experimental das interações identificadas, na otimização dos modelos de inibidores de protease e proteases de *Phytophthora* e na aplicação prática desses conhecimentos para o desenvolvimento de abordagens sustentáveis de controle de doenças em citrus.

Em suma, este trabalho contribui para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação e defesa de plantas de citrus por meio da integração de dados de expressão gênica, redes de interação PPI e estudos de biologia estrutural. Esperamos que essas descobertas possam ter aplicações práticas na proteção de cultivos de citrus e na promoção da agricultura sustentável.