

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



CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PROTEÍNAS INDUTORAS DE
ETILENO E NECROSE (NEP-LIKE) EM *Moniliophthora perniciosa*

MARIA LUÍZA DO CARMO SANTOS

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2019

MARIA LUÍZA DO CARMO SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PROTEÍNAS INDUTORAS DE
ETILENO E NECROSE (NEP-LIKE) EM *Moniliophthora perniciosa***

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

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2019

S237

Santos, Maria Luíza do Carmo.

Caracterização molecular de proteínas indutoras de Etileno e Necrose (Nep-like) em *Moniliophthora perniciosa*. / Maria Luíza do Carmo Santos. – Ilhéus, BA: UESC, 2019
xii, 97f. : il.

Orientadora: Fátima Cerqueira Alvim
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.
Inclui referências.

1. Vassoura-de-bruxa (Fitopatologia). 2. Plantas – Efeito do etileno. 3. Morte celular. 4. Modelagem molecular. I. Título.

CDD 632.4

MARIA LUÍZA DO CARMO SANTOS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PROTEÍNAS INDUTORAS DE ETILENO E
NECROSE (NEP-LIKE) EM *Moniliophthora perniciosa*

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

APROVADA: 28 de fevereiro de 2019

Dra Elizabeth Amélia Alves Duarte
(UFRB)

Dra Milena do Amaral Santos
(UESC)

Dra Luciana Rodrigues Camilo
(UESC)

Dra Fátima Cerqueira Alvim
(UESC – Orientadora)

“Um homem sem amigos é uma terra sem umidade, uma manhã sem orvalho, um céu sem nuvens. Os amigos não são os que nos bajulam, mas os que desmistificam nosso heroísmo e revelam nossa fragilidade. Um intelectual sem amigos é um livro sem conteúdo.”

(Augusto Cury)

DEDICO:

A Deus, por tudo que sou e tudo que tenho;

Aos meus pais, Lúcia e Francisco, meus exemplos de vida;

À minha família e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por todas as bênçãos concebidas. Por me guiar e proteger.

Aos meus pais, pela paciência, zelo, dedicação, amor incondicional e por sempre acreditar no meu potencial.

Ao meu namorado Francis, pelo apoio, compreensão, espera, sensibilidade e carinho.

A todos da minha família (Silveira, Roseno e Carmo), que sempre estiveram comigo, torcendo pelo meu sucesso.

À Mariana, Laísa, Gabriela, Maiara, Isabela, Tainah e Ivina, pelos anos de amizade verdadeira.

Às minhas mãezinhas do coração (Tia Norma e Tia Anair), pelo cuidado – vocês são especiais.

Aos meus colegas de profissão e amigos; Nayara, Thaynara, Natasha, Monaliza, Geise, Ariana, Ariadna, Thaís, Fernanda, Ivina, Bruna, Maria, Alda, Letícia, Italo, Grazielle, Dalma, Lorena, Glaucia, Carine, Dandara e Adielle. Pelo conhecimento compartilhado, pelos auxílios nos experimentos, pelas risadas e companhias.

Principalmente as Rbs, a família que a UESC me presenteou, pra deixar minha jornada mais leve, me acrescentar como profissional e pessoa. Por se preocuparem comigo e me oferecer colo quando preciso. MARAVILHOSAS!

À minha orientadora Dra. Fátima Cerqueira Alvim e co-orientador Dr. Carlos Priminho Pirovani, pelas ideias, discussões, incentivo, por oferecer suporte, dedicação, pela confiança e competência. E ao co-orientador, Dr. Cristiano Villela Dias, por me fornecer o suporte e por todo apoio concedido.

A todos do Centro de Genética e Biotecnologia (CBG), especialmente proteômicos e LCT, por facilitar o desenvolvimento da pesquisa. Aos técnicos, principalmente, Horlei, Fábio, Oscar e Aline, pela disposição e os auxílios.

A todos os docentes e funcionários do Programa de Pós-graduação de Genética e Biologia molecular e a Universidade Estadual de Santa Cruz.

À FAPESB, pela concessão de bolsas.

E a todos que construíram comigo mais um sonho. GRATIDÃO!

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 <i>Moniliophthora perniciosa</i> e o cacaueteiro.....	4
2.2 O que ocorre na interação planta-patógeno?.....	8
2.3 Família NLP e a relação com a patogenicidade.....	11
2.4 Nep em <i>Moniliophthora perniciosa</i>	16
3. REFERÊNCIAS.....	18
4. CAPÍTULO 1: Identificação de potenciais alvos de <i>Theobroma cacao</i> na interação com MpNEP2 do fungo causador da vassoura-de-bruxa.....	24
RESUMO.....	26
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3. RESULTADOS.....	33
4. DISCUSSÕES.....	54
5. CONCLUSÕES.....	65
6. REFERÊNCIAS.....	67
5. CAPÍTULO 2: Indução <i>in vitro</i> de proteínas indutoras de necrose e etileno (MpNEP) em <i>Moniliophthora perniciosa</i>	75
RESUMO.....	76
1. INTRODUÇÃO.....	77
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	78
3. RESULTADOS.....	82
4. DISCUSSÕES.....	91
5. CONCLUSÕES.....	94
6. REFERÊNCIAS.....	95

RESUMO

SANTOS, Maria Luíza do C. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – Bahia, fevereiro de 2019. **Caracterização molecular de Proteínas Indutoras de Etileno e Necrose (Nep-Like) em *Moniliophthora Perniciosa***. Orientadora: Dra. Fátima Cerqueira Alvim (UESC), Co-orientadores: Dr. Carlos Priminho Pirovani (UESC) e Dr. Cristiano Villela Dias (CIC).

Moniliophthora perniciosa (Mp) é o agente etiológico da vassoura-de-bruxa, uma doença que afeta em grande escala a produção de cacau. Um determinante para a virulência desse fungo é a produção de elicitores exógenos e/ou endógenos que induzem a morte do tecido da planta hospedeira na mudança de fase da doença. Dentre esses, estão as proteínas indutoras de necrose e etileno conhecidas como *Nep-like proteins* ou NEP. Mp possui cinco cópias do gene que codificam proteínas NEP (MpNEP). Estudos anteriores demonstraram que os genes 1 e 2 são os mais expressos durante o desenvolvimento da doença. Contudo, pouco se conhece sobre o mecanismo de ação pelo qual essas proteínas induzem a necrose e morte celular. Nesta perspectiva, o presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização molecular da proteína MpNEP (NLP), por meio de ensaios *in vitro* e *in silico*. Análises *in silico* comparando as cinco sequências de resíduos de aminoácidos de MpNEPs mostraram que as MpNeps 1-5 possuem regiões conservadas além da que caracteriza a família, com fosforilações preditas localizadas mesmos sítios e em sítios diferentes entre as sequências, sítios de N-glicosilação apenas nas proteínas MpNep1 e MpNep5. As análises revelaram a presença de peptídeo sinal (MpNEP1-3), a predição dos pontos isoelétricos variáveis (5.79-8.28) e peso molecular característico da família NLP (24-26kDa), bem como localização vacuolar, exceto a MpNEP2 já preditos em estudos anteriores. Ainda, possuem 2 à 6 possíveis regiões intrinsecamente desordenadas de 13 à 23 resíduos de aminoácidos em longas extensões, podendo ser domínios importantes para essas proteínas exercerem sua função. Ademais, foram identificados potenciais alvos moleculares *in vitro* com os quais MpNEP2 interage no cacau. A rMpNEP2 acoplada à sepharose ativada com CNBr foi utilizada como armadilha para a captura de proteínas do tecido de *Theobroma cacao*. As proteínas metalo hidrolase oxidoredutase, fator de resposta a auxina, esfingosina quinase, proteína tipo formina, membro da superfamília de proteínas ENTH ANTH VHS e 11-beta-hidroxisteroide desidrogenase foram identificadas por MS/MS, após captura com a armadilha contendo rMpNEP2. Análises no Blast2GO e rede de interações com homólogos dessas proteínas revelaram que elas participam de processos importantes no citoesqueleto da célula, sinalização e respostas de defesa da planta. As análises de modelagem e *docking* permitiram validar as interações das proteínas identificadas com a MpNEP2. Uma outra abordagem utilizada neste estudo foi a imunodeteção de MpNEP em tecidos de cacau infectado e não infectado (controle) que revelou uma maior abundância de proteína com pesos moleculares de MpNEP em uma fase que antecede o aparecimento da necrose no tecido da planta. Visando identificar se MpNEP pode ser produzida *in vitro* e se tem expressão induzida em resposta ao hospedeiro, diferentes isolados do fungo *M. perniciosa* foram cultivados em meio de cultura acrescido ou não de extrato bruto vegetal. O *immunoblotting* revelou que MpNEP pode ser induzida *in vitro* e induzida pelo extrato vegetal de planta hospedeira e não hospedeira, podendo gerar ainda, mudanças na composição ou no arranjo dos componentes da parede celular (PC), e resposta aumentada de enzima antioxidante (GPX). Em conjunto, esses resultados melhoram a compreensão sobre os mecanismos, pelos quais a MpNEP induz aumento de resposta na planta para uma possível necrose, contribuindo para novas perspectivas sobre atividades dessa proteína no patossistema da vassoura-de-bruxa.

Palavras-chave: MpNep2, patossistema, vassoura-de-bruxa, docking molecular

ABSTRACT

SANTOS, Maria Luíza do C. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – Bahia, fevereiro de 2019. **Molecular characterization of Ethylene Inducing Proteins and Necrosis (Nep-Like) in *Moniliophthora perniciosa*.** Advisor: Dra. Fátima Cerqueira Alvim (UESC), Co-Advisors: Dr. Carlos Priminho Pirovani (UESC) and Dr. Cristiano Villela Dias (CIC).

Moniliophthora perniciosa (Mp) is the etiological agent of the witch's broom (WB), a disease that affects in large-scale the cocoa production. A determinant for the virulence of this fungus is the production of exogenous and /or endogenous elicitors. Those may induce the death of the host tissue during the phase change of the pathogen. Among these are the necrosis and ethylene-inducing proteins known as Nep-like proteins or NEP. Five copies of the gene encoding NEP proteins (MpNEP) was identified on Mp genome. Previous studies have shown that genes 1 and 2 are the most expressed during WB development. However, little is known about the mechanism of action by which these proteins induce necrosis and cell death. In this perspective, the present study had the goal of performing the molecular characterization of the MpNEP protein (NLP), by *in vitro* and *in silico* assays. *In silico* analyzes comparing the five amino acid residue sequences of MpNEPs showed that the MpNeps 1-5 have conserved regions beyond that characterizing the family, with predicted phosphorylations located at the same sites and at different sites between the sequences, N-glycosylation sites only in the MpNep1 and MpNep5 proteins. The analyzes revealed the presence of signal peptide (MpNEP1-3), the prediction of the variable isoelectric points (5.79-8.28) and characteristic molecular weight of the NLP family (24-26kDa), as well as vacuolar localization, except in the MpNEP2 already predicted in previous studies. Furthermore, they have 2 to 6 possible intrinsically disordered regions of 13 to 23 amino acid residues over long stretches, which may be important domains for these proteins to develop their function. In addition, potential *in vitro* molecular targets, with which MpNEP2 interacts with cocoa, were identified. RMpNEP2 coupled to CNBr-activated sepharose was used as a trap for the capture of proteins from *Theobroma cacao* tissue. The proteins metallohydrolase oxidoreductase, auxin response factor, sphingosine kinase, formin-like protein, member of the ENTH ANTH VHS superfamily and 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase were identified by MS / MS after capture with the rMpNEP2-containing trap. Analyzes in the Blast2GO and network of interactions with homologues of these proteins revealed that they participate in important processes in the cell cytoskeleton, signaling and defense responses of plants. The modeling and docking analyzes allowed to validate the interactions of the proteins identified with the MpNEP2. Another approach used in this study was the immunodetection of MpNEP in infected and uninfected (control) cocoa tissues which revealed an increased level of MpNEP molecular weight protein in a phase preceding the onset of necrosis in plant tissue. In order to identify whether MpNEP can be produced *in vitro* and can be induced in response to the host extract, different isolates of *M. perniciosa* were cultivated in the presence or not of crude vegetable extract (tobacco and cocoa). Immunoblotting revealed that MpNEP can be induced *in vitro* and induced by plant extracts from host and non-host plants, and may also lead to changes in composition or arrangement of cell wall components (PC) and increased response of antioxidant enzyme (GPX). Taken together, these results improve the understanding of the mechanisms by which MpNEP induces an increase in plant response to a possible necrosis, contributing to new perspectives on the activities of this protein in the witch-broom pathosystem.

Keywords: MpNep2, pathosystem, witch-broom, molecular docking

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Produção de cacau em toneladas por ano safra 2017.....	5
Figura 2. Ciclo de vida do fungo <i>M. pernicioso</i> e os sintomas durante o desenvolvimento da doença vassoura-de-bruxa.....	7
Figura 3. Aspectos gerais de parte dos processos moleculares que ocorrem durante uma interação planta-patógeno.....	10
Figura 4. Representação gráfica simples da distribuição da família NLP entre diferentes espécies, fornecida pelo <i>website PFAM</i> (2018).....	12
Figura 5. Proteína NLP de <i>Phytium aphanidermatum</i> cristalografada (NLP _{pya}).....	13
Figura 6. Proteína MpNep2 cristalografada.....	17

CAPÍTULO 1

Figura 1. Alinhamento de sequência de cinco NEPs de <i>M. pernicioso</i> (MpNEP) e suas respectivas identidades de sequências de aminoácidos.....	34
Figura 2. Predições de regiões desordenadas entre as sequências de proteínas MpNEP1-5, obtidas a partir do servidor PONDR®	36
Figura 3. Destaque das regiões desordenadas no alinhamento entre as sequências de NEP1-5 de <i>M. pernicioso</i>	37
Figura 4. SDS-PAGE do perfil da proteína indutora de necrose e etileno (NEP)....	38
Figura 5. Teste de viabilidade da NEP purificada aplicada em folhas de <i>Nicotiana tabacum</i>	38
Figura 6. Rede de interações com proteínas de <i>A. thaliana</i> ortólogas as proteínas alvos capturadas em extrato de <i>T. cacao</i>	42
Figura 7. Modelo 3D do Fator de Resposta a Auxina (AFR).....	43
Figura 8. Modelo 3D da 11-beta hidroxisteroide desidrogenase.....	44

Figura 9. Modelo 3D da superfamília ENTH ANTH VHS.....	45
Figura 10. Modelo 3D da superfamília Esfingosina quinase.....	46
Figura 11. Modelo 3D da proteína Tipo formina.....	47
Figura 12. Modelo 3D da Metalo hidrolase oxiduredutase.....	48
Figura 13. Docking entre Fator de Reposta a Auxina (ARF) e MpNEP2.....	49
Figura 14. Docking entre 11-beta hidroxisteroide desidrogenase e MpNEP2.....	50
Figura 15. Docking entre superfamília ENTH ANTH VHS (EAV) e MpNEP2.....	51
Figura 16. Docking entre Esfingosina quinase e MpNEP2.....	52
Figura 17. Docking entre Tipo formina e MpNEP2.....	53
Figura 18. Docking entre Metalo hidrolase oxiduredutase e MpNEP2.....	53
Material suplementar 1.....	65

CAPÍTULO 2

Figura 1. Material biológico de <i>Theobroma cacao</i> coletado na CEPLAC.....	78
Figura 2. SDS-PAGE com 60 µg de proteína obtida de <i>T. cacao</i> de amostras controle ou infectada com Mp	83
Figura 3. Immunoblotting utilizando o anticorpo policlonal contra MpNEP.....	83
Figura 4. Immunoblotting utilizando o anticorpo policlonal contra MpNEP, purificado por imunoabsorção	84
Figura 5. Proteínas isoladas de micélio saprofítico e secretoma de dois isolados de <i>M. pernicioso</i> (biótipos S e C).....	85
Figura 6. Imunodeteção de MpNEP em secretomas e micélios saprofíticos de dois isolados de <i>M. pernicioso</i> induzidos e não induzidos com extrato de <i>T. cacao</i>	86
Figura 7. Proteínas isoladas de micélio de Mp (1441 e 4145) e secretoma do isolado 4145 de Mp resolvida em SDS PAGE.....	87
Figura 8. Imunodeteção de MpNEP em micélio e secretoma de Mp (isolado 4145), induzido ou não induzido <i>T. cacao</i> e <i>N. tabacum</i>	88
Figura 9. Imunodeteção de MpNEP em micélio de Mp (isolado 1441), induzido	

ou não induzido com extrato de <i>T. cacao</i> e <i>N. tabacum</i>	88
Figura 10. Análise de resistência ao estresse da parede celular de Mp.....	89
Figura 11. Análise de resistência ao estresse da parede celular de Mp.....	90
Figura 12. Teste de Atividade da Peroxidase de Guaiacol (GPX) de micélios não induzidos, induzido com extrato <i>N. tabacum</i> ou <i>T. cacao</i> de duas variedades de Mp (1441 e 4145).....	91
Material suplementar 1.....	94

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Análise de características estruturais das sequências dos resíduos de aminoácidos das proteínas NLPs de <i>M. pernicioso</i>	34
Tabela 2. Proteínas de <i>T. cacao</i> dos genótipos CCN51 e Catongo capturadas por MpNEP2 recombinante e identificadas em espectrometria de massas (MS/MS).....	39
Tabela 3. Análise de localização, função celular e processo biológico obtida pelo servidor BLAST2GO, das proteínas alvos capturadas por MpNEP2.....	39
Tabela 4. Lista de proteínas ortólogas entre cacau e <i>A. thaliana</i> e suas similaridades.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

Mp – *Moniliophthora perniciosa*

VB – vassoura-de-bruxa

NEP – Proteínas indutoras de Necrose e Etileno

PAMPS/MAMPS – Padrões Moleculares Associados a Patógenos/Microrganismo

DAMPS – Moléculas Associadas a Danos

PRRs – Receptores de Reconhecimento Padrões

PTI – Imunidade desencadeada pelo patógeno

ETI – Imunidade desencadeada pelo efector

AJ – ácido jasmônico

AS – ácido salicílico

NLP – Proteínas do tipo Nep

NPPI – *Necrosis inducing Phytophthora protein*

MpNEP – Proteínas indutoras de Necrose e Etileno de *Moniliophthora perniciosa*

rMpNEP – MpNEP recombinante

SPHK1 – Esfingosina quinase 1

ARF – Fator de Resposta a Auxina

Fh5 – Formina homóloga

HSD5 – hidroxisteroide desidrogenase 5

ACT12 – actina 12

GLD – glicinas desidrogenases

1. INTRODUÇÃO

A cacauicultura é considerada uma das principais culturas mundiais, pois produz amêndoas que são matéria-prima para o chocolate, um produto consumido em todo mundo.

Na década 80 cerca 20% da produção mundial de cacau era proveniente do Brasil e quase 95% de toda produção do país tinha origem no sudeste da Bahia, elevando o Brasil como o segundo maior produtor do mundo. No entanto, no início da década de 90 as plantações de cacau na Bahia atravessaram uma grande crise ocasionada pela introdução da vassoura-de-bruxa (VB), que em dez anos dizimou 70% de toda produção no estado. A doença até hoje limita drasticamente a produtividade agrícola, implicando em perdas econômicas severas a cada ano (ALVIM; NAIR, 1986; THOMAS et al., 2012; SOUZA, et al., 2018).

O fungo *Moniliophthora perniciosa* (Mp) é o agente etiológico da VB, cujo ciclo de vida é classificado como hemibiotrófico, possuindo dois estágios de desenvolvimento. O primeiro estágio, extremamente prolongado, é o biotrófico, caracterizado pelo desenvolvimento de hifas monocarióticas entre as células vivas do cacau, induzindo no local da infecção modificações fisiológicas e morfológicas. A planta em resposta a interação, induz o intumescimento dos ramos, a hiperbrotação e hiperplasia, que caracteriza a vassoura verde. A infecção em almofadas florais ocasiona a formação de estruturas anormais nos frutos (tipo morango), gerando os sintomas de vassouras almofadas (HOLLIDAY, 1980; MEINHARDT et al., 2008; SENA, et al., 2014). Após o período prolongado (aproximadamente três à nove semanas) de interação com as hifas monocarióticas, o tecido infectado colapsa e um processo similar à senescência ocorre, caracterizando a vassoura seca. Nesse momento da interação, o fungo sofre transição das hifas primárias para secundárias (binucleadas ou dicarióticas) que apresentam grampo de conexão e se desenvolvem em células necróticas e mortas nos tecidos infectados, esse é o estágio necrotrófico da doença que finaliza com a formação de basidiomas nos ramos mortos do cacau, completando assim o ciclo de vida do Mp (SCARPARI et al., 2005).

O processo de interação planta-patógeno compreende modificações substanciais no padrão de expressão gênica em ambos os organismos. Durante a resposta na invasão microbiana, as plantas desencadeiam uma série de mecanismos de defesa, dentre esses o reconhecimento das moléculas do patógeno, reforço da parede celular, produção de espécies reativas de oxigênio e compostos tóxicos aos microrganismos. Em contrapartida os patógenos

possuem estratégias, como secreção de moléculas efetoras que servem tanto para evadir o sistema imune da planta como para nutrição e reprodução no tecido do hospedeiro (WIRTHMUELLER et al., 2013).

Desvendar os mecanismos moleculares envolvidos na interação cacau: *M. pernicioso* é imprescindível para compreender as peculiaridades do patossistema VB. A partir do sequenciamento do genoma do Mp foi possível identificar genes que codificam moléculas efetoras que são determinantes para a virulência desse fungo, dentre essas, estão as proteínas indutoras de necrose e etileno conhecidas como *Nep-like proteins* ou proteínas indutoras de necrose e etileno (NEP) (MONDONGO et al., 2008).

O gene *Nep* foi descrito pela primeira vez por Bailey em 1995 no oomiceto *Fusarium oxysporum*, como uma proteína de 24 kDa que induz a produção de etileno e necrose. Desde então, pesquisas tem identificado genes que codificam proteínas NEP nos mais diversos organismos patogênicos filogeneticamente distintos, como em bactérias (*Erwinia* spp., *Vibrio pommerensis*, *Bacillus halodurans*, *Streptomyces coelicolor*) (JORES et al., 2003; PEMBERTON; SALMOND, 2004), oomicetos (espécies de *Phytophthora* sp., *Phytium* sp. e *Hyaloperonospora arabidopsidis*) (PEMBERTON; SALMOND, 2004; CABRAL, et al., 2012) e fungos (*Neurospora crassa*, *Moniliophthora pernicioso*, *Moniliophthora roreri* e *Botrytis cinerea*) (GALAGAN et al., 2003; PEMBERTON; SALMOND, 2004; GARCIA et al., 2007; ARERAS et al., 2010; MEINHARDT et al., 2014).

Mp foi o primeiro fungo do Filo Basidiomycota a ter identificado esses genes (GARCIA et al., 2007). Mp possui cinco cópias do gene que codificam proteínas MpNep, que são classificadas em I, II ou III, de acordo com os resíduos de cisteínas. Estudos anteriores demonstraram que os genes 1 e 2 são os mais expressos durante o desenvolvimento da doença, principalmente na fase necrotrófica da VB do cacau, que após os primeiros sinais de senescência, aumenta a expressão de *MpNep2* no fungo, induzindo morte celular nos tecidos remanescentes do cacau (GARCIA et al., 2007; GIJZEM; NURNBERGER, 2006; ZAPAROLI et al., 2011; OOME; ACKERVEKEN, 2014).

Os mecanismos de ação pelos quais a MpNep induz morte celular e como essas proteínas participam no desenvolvimento da doença, ainda são pouco conhecidos. Desse modo, a utilização de ferramentas moleculares como análises proteicas a partir de ensaios *in vitro* e *in silico*, fornecem uma alternativa para auxiliar na elucidação desses processos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização molecular de proteínas MpNEPs (NLPs), por meio de ensaios *in vitro* e *in silico*.

Para isto, utilizamos técnicas como análise de comparação entre sequências *in silico* das cinco cópias de MpNEPs presentes no genoma de Mp, capturas *in vitro* para seleção de alvos de MpNEP2, seguido de análise por espectrometria de massas para identificação dos alvos, modelagem de proteínas identificadas e *docking* molecular entre as proteínas identificadas e MpNEP2. Ademais, foram realizadas imunodeteções de MpNEPs em amostras de tecidos de *Theobroma cacao* em três diferentes estágios da VB, em micélios saprofíticos e secretoma após induções *in vitro*. Além de abordagens como avaliações de estresse de parede desses micélios e atividade enzimática dos micélios após tratamentos. Destarte, tentamos contribuir para o conhecimento acerca dos mecanismos da ação de NLP. Os dados aqui apresentados fornecem novas informações sobre MpNEP2 e suas possíveis contribuições no patossistema da VB.

1.2 OBJETIVOS:

Geral

Realizar caracterização molecular de proteínas MpNep de *Moniliophthora perniciosa*, por meio de ensaios *in vitro* e *in silico*.

Específicos

- (1) Analisar diferenças pós-traducionais entre as proteínas MpNEP1-5 nas sequências de resíduos de aminoácidos;
- (2) Identificar potenciais proteínas alvo da MpNEP2 em extratos ativos de *Theobroma cacao* (CCN51 e Catongo), a partir de armadilha com rMpNEP2 imobilizada em resina;
- (3) Propor mecanismos pelos quais MpNEP2 pode desencadear morte celular a partir da identificação de alvos moleculares em *Theobroma cacao*;
- (4) Detectar o acúmulo de MpNEP em amostras de tecido de cacau infectado com Mp;
- (5) Verificar se extratos de cacau e tabaco, utilizados como substratos induzem a proteína MpNEP em micélio saprofítico de *M. perniciosa*;

(6) Detectar se existe diferença na resposta de indução entre dois isolados contrastantes de *M. perniciosa*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Moniliophthora perniciosa* e o cacaueteiro

Theobroma cacao é uma espécie arbórea tropical, perene, nativa da bacia amazônica da América do Sul, pertencente à família Malvaceae, que provavelmente foi introduzida na América Central (MOTAMAYOR et al., 2002; RUSCONI; CONTI, 2010; THOMAS et al., 2012). Existem três grupos descritos para *T. cacao*, distintos por variações na morfologia e anatomia interespecífica: Criollo (*T. cacao* spp. Criollo); Forastero (*T. cacao* spp. Sphaerocarpum) e Trinitário, sendo este último o resultado do cruzamento entre o Criollo e Forastero (CHEESMAN, 1944; PRIDMORE et al., 2000; MOTAMAYOR et al., 2002). O cacaueteiro, como é chamado, produz amêndoas que são exploradas como matéria-prima para a indústria de chocolate, fármacos e cosméticos, dentre outros derivados. Os subprodutos são amplamente consumidos em todo mundo, sendo, portanto uma cultura de relevância mundial (RUSCONI; CONTI, 2010). Contudo, o cultivo se restringe a regiões específicas, devido as necessidades morfoclimáticas da cultura. Basicamente as áreas produtivas localizam-se espalhadas em estados do Brasil e países da África. Sendo nesse último as áreas produtivas de aproximadamente cinco ha que faz uso de mão de obra familiar (BEG et al., 2017; WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2018). A cacauicultura é considerada um dos mais importantes cultivos agrícolas mundiais, sendo o Brasil um dos principais produtores das Américas, onde a Bahia e o Pará são as duas zonas de maior produção, como mostrado na figura 1, em que aparece a produção em toneladas, por estados brasileiros, no ano de 2017 (HEBBAR, 2007; IBGE, 2018).

Fonte: IBGE – Levantamento Sistemático da Produção Agrícola

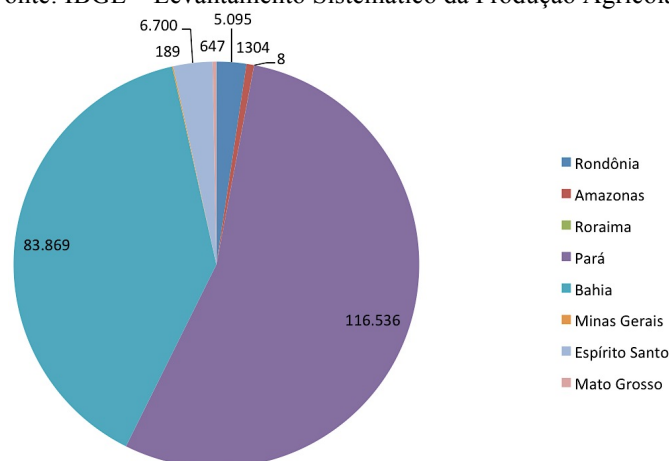


Figura 1. Produção de cacau em toneladas por ano safra 2017.

No entanto ao longo da história, a produção de cacau enfrentou muitos problemas, tais como déficit hídrico, ocasionado por alterações climáticas, e com doenças associadas a fitopatógenos. Contudo, foi no início da década de 90 que o cultivo no Brasil atravessou a maior crise devido à introdução da doença vassoura-de-bruxa na Bahia. Essa doença é causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, que devido às condições edafoclimáticas da região se disseminou rapidamente pelas propriedades produtoras de cacau, reduzindo drasticamente a produtividade e a qualidade das amêndoas (PEREIRA, et al 1989; TEIXEIRA, et al 2015). Em um período de 10 anos após a sua chegada, a doença acarretou na destruição de 70% das plantações, e a produção que havia alcançado 400 mil toneladas no ano de maior produção, foi reduzida a 123 mil toneladas no ano de 2000 (AGRIANUAL, 2004; ALMEIDA, 2016). A doença atualmente estende-se a quase todos os países produtores de cacau da América do Sul, mas limitado pelo Canal do Panamá na América Central e partes do Caribe, provocando a redução significativa da produção de frutos e qualidade das amêndoas, o que implica em limitações para o cultivo de cacau (SOUZA, et al., 2018; TEIXEIRA, et al 2015).

O gênero *Moniliophthora* pertence a família *Marasmiaceae* e dentre as espécies descritas estão: *M. perniciosa*, *M. roreri* (agente patogênico da Monília do cacau), *M. canescens* (espécie saprotrófica isolada da Ásia) e *Moniliophthora* endofítica de capim isolada no Novo México (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005; KEREKES; DESJARDIN, 2009).

M. perniciosa é um fungo basidiomiceto com ciclo de vida hemibiotrófico, ou seja, possui dois estágios de desenvolvimento, um monocariótico (tipo biotrófico) e outro dicariótico/necrotrófico, morfologicamente diferentes entre si (EVANS, 1980). No primeiro estágio do ciclo da doença, em ambiente noturno e alta umidade principalmente (FRIAS et al.,

1991) os basidiósporos são propiciados a transpor-se até o hospedeiro e penetrar a partir de aberturas (como feridas, tricomas e estômatos), nos tecidos jovens em desenvolvimento (folhas, ramos e frutos) sem que haja formação de estruturas especializadas (como o apressório) (Figura 2-A) (CALLE et al., 1982; MEINHARDT et al., 2008). Nesta fase biotrófica de desenvolvimento do fungo, as hifas monocarióticas, são espessas, crescem lentamente nos espaços intercelulares e por isso apresentam baixa densidade quando a comparamos com o segundo tipo de micélio (HOLLIDAY, 1980; MEINHARDT et al., 2008; SENA, et al., 2014). Nesta fase, o patógeno induz uma série de mudanças metabólicas, moleculares e fisiológicas nos ramos infectados. Essas mudanças não levam a morte do ramo, mas afetam drasticamente o seu desenvolvimento. Pode-se observar como resposta da planta a interação, o intumescimento do ramo, a hiperbrotação e hiperplasia, o que caracteriza a vassoura verde (Figura 2-B) (EVANS, 1980; ORCHARD; HARDWICK, 1988; PENMAN et al., 2000; SCARPARI et al., 2005). A germinação dos esporos nas almofadas florais do cacau levam ao desenvolvimento de vassouras almofadadas, estruturas de flores anormais que produzem pequenos frutos partenocárpicos com formas atípicas, tipo morango (OLIVEIRA; LUZ, 2007). Após um período de aproximadamente um a dois meses, observa-se no cacau a transição da vassoura-verde para vassoura seca, caracterizada por modificações sofridas no hospedeiro que levam a necrose e morte dos ramos infectados (Figura 2-D) (EVANS, 1980; LAWRENCE et al., 1991). Simultaneamente nesta transição, o fungo desenvolve-se rapidamente nas células necróticas ou mortas, sofrendo alterações nas hifas para uma estrutura binucleada, obtendo uma formação mais estreita, com grampo de conexão, sendo essa fase do ciclo de vida do fungo chamada de saprofítica ou necrotrófica (KILARU; HASENSTEIN, 2005; TEIXEIRA et al., 2015) (Figura 2-C). As alterações intermitentes de umidade e seca estimulam a formação de basidiocarpos que produzem novos basidiósporos que irão se dispersar para uma nova planta ou outra região da mesma infectada, iniciando um novo ciclo (Figura 2) (ALMEIDA et al., 1997; MEINHARDT et al., 2008).

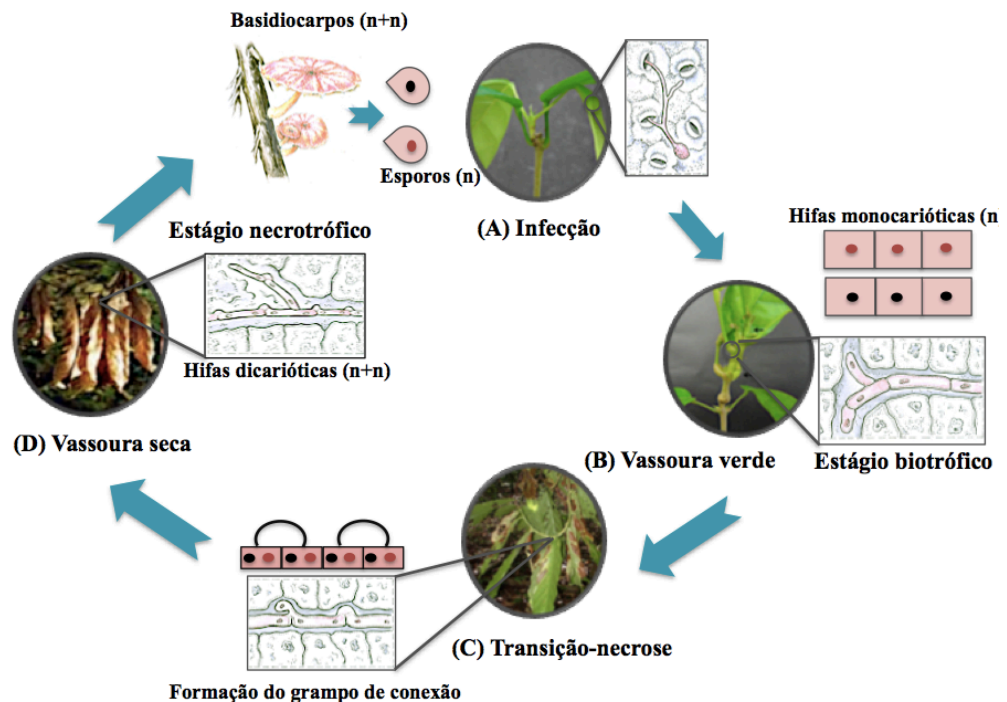


Figura 2. Ciclo de vida do fungo *M. pernicioso* e os sintomas durante o desenvolvimento da doença vassoura-de-bruxa. De acordo com Meinhardt et al., 2008, Farquharson, 2014 e Teixeira et al., 2015.

O patógeno *M. pernicioso* possui como hospedeiros outras espécies do gênero *Theobroma* e outras famílias de plantas não relacionadas, apresentando um nome específico para cada tipo de associação, abrangendo assim quatro diferentes biótipos (C, S, L e H): os isolados que infectam espécies do gênero *Theobroma* e *Herranea* (família Malvaceae) são nomeadas de biótipos C; os que infectam membros da família Solanaceae (como tomate) são denominados biótipos S; os que estão associados às espécies da família Bignoniaceae (como lianas) são chamados de biótipos L; isolados da família Malpighiaceae são os biótipos H (BASTOS; EVANS, 1985; HEDGER; PICKERING; ARAGUNDI, 1987; RESENDE et al., 2000; GRIFFITH et al., 2003).

Com a finalidade de elucidar os mecanismos que ocorrem no patossistema entre *M. pernicioso* e o cacaueiro, diversos estudos foram sendo realizados nas últimas décadas. Inicialmente, entre as décadas de 1980 e 1990, as pesquisas elucidaram as informações básicas sobre a biologia do fungo, descrevendo o ciclo de vida hemibiotrófico e os processos de infecção no *Theobroma cacao* (EVANS, 1980; CALLE et al., 1982; FRIAS et al., 1991; GRIFFITH; HEDGER, 1994). A compreensão da biologia do fungo teve grandes avanços a partir do Projeto Genoma, iniciado no ano de 2000, que revelou as primeiras sequências de DNA do patógeno, possibilitando a identificação de genes que codificam para proteínas potencialmente relacionadas com funções moleculares importantes para o desenvolvimento

do patossistema vassoura-de-bruxa (MONDENGO et al., 2008). O sequenciamento dos genomas do cacau de variedades Criollo e Matina, também apresentou um papel potencial para o conhecimento dessa associação (ARGOUT, et al., 2011; MOTAMAYOR et al., 2013).

Na década de 2000 as pesquisas com enfoque na identificação das bases moleculares da interação *M. perniciosa*:cacau estavam iniciadas. Como parte dessa iniciativa, foi descrito em 2005 uma análise geral dos processos bioquímicos que ocorrem no interior dos ramos de cacau infectados com *M. perniciosa* durante a interação. Pela primeira vez foram identificados que componentes como alcaloides, compostos fenólicos e taninos tem a concentração aumentada na planta. Contudo, esses mecanismos de defesa da planta desencadeadas em resposta ao ataque do patógeno, se mostram insuficientes para evitar o progresso da doença. Observa-se assim que essa cascata de modificações, dentre elas o aumento na produção de etileno, terminam induzindo a morte do tecido infectado (SCARPARI et al., 2005). Posteriormente, estudos avançaram promovendo mais informações sobre os mecanismos moleculares envolvidos no patossistema (CEITA et al., 2007; THOMAZELLA et al., 2012; BARAU et al., 2015). Verificando por exemplo, que durante o estágio biotrófico do fungo, ocorre a produção de proteínas de resposta do cacau, como as tipo quinase ou receptor-like, que são transmembranares que reconhecem padrões moleculares do patógeno, proteínas da superfamília relacionada à patogênese (PR1-10) e NB-LRR que são acumuladas durante a vassoura-de-bruxa. Em contrapartida o fungo possui um arsenal de genes que codificam proteínas que o protegem contra a resposta do hospedeiro (TEIXEIRA et al., 2014).

Dentre as proteínas identificadas como importantes para o desenvolvimento da doença durante o estágio necrotrófico, estão as indutoras de necrose e etileno (NEP). Apesar de não se ter elucidado ainda o mecanismo pelo qual as NEPs funcionam, sabe-se que essas proteínas são produzidas e secretadas pelo fungo e são capazes de induzir morte celular no tecido vegetal. Essa é uma etapa importante para o desenvolvimento do ciclo de vida do patógeno, visto que os basidiomas se desenvolvem a partir dos tecidos mortos do hospedeiro, o que parece ter uma função relevante no progresso da vassoura-de-bruxa (GARCIA et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2014).

2.2 O que ocorre na interação planta-patógeno?

A co-evolução entre a planta, na condição de hospedeiro, e o patógeno, proporcionou

o desenvolvimento de mecanismos para invasão microbiana fortemente adaptada e estratégias para defesa contra-ataques das plantas. Muitos patógenos microbianos exigem nutrientes de hospedeiros vivos, o que faz necessário uma interação parasítica entre esses organismos (WIRTHMUELLER et al., 2013). Uma vez que os propágulos do patógeno, em condições ambientais favoráveis, são depositados na superfície do hospedeiro, iniciam mutuamente uma comunicação que desencadeia modificações tanto morfológica quanto bioquímicas, no patógeno para dar início a sua infecção e do hospedeiro que responde a essa interação (ZADOKS; SCHEIN, 1979; BERGAMIN FILHO et al., 1995).

São diversas as estratégias utilizadas pelos patógenos de plantas. As bactérias conseguem se proliferar nos espaços intercelulares (apoplasto) a partir de estruturas como estômatos e hidatódios ou via feridas pré-formadas (MICHHEREFF, 2001). Os pulgões e nematoides penetram nas células vegetais por meio do estilete (MICHHEREFF, 2001; JONES; DANGL, 2006). Os fungos podem infectar de forma direta, com as hifas sobre a superfície ou por aberturas naturais e feridas nas células vegetais (JONES; DANGL, 2006). Também, fungos e oomicetos patogênicos conseguem penetrar por estruturas como haustórios na membrana plasmática da célula hospedeira (JONES; DANGL, 2006).

Na primeira fase da interação do patógeno com a planta, moléculas chamadas de **PAMPS/MAMPS** (Padrões moleculares Associados a Patógenos/Microrganismos) são produzidas pelo patógeno. Essas moléculas são epítomos específicos dos microrganismos, ou constituinte necessário para sobrevivência do mesmo, tais como a quitina (componente da parede celular do fungo) ou flagelina (proteína integrante da bactéria), as quais sinalizam a presença desse fitopatógeno para o hospedeiro (Figura 3 – A) (ZIPFEL, 2008; ZIPFEL, 2014). Sabe-se também que a liberação de moléculas pelas próprias células hospedeiras (**DAMPS**), resultantes do dano provocado pelo ataque, podem também desempenhar papel de sinalizadoras (Figura 3 – B) (BOLLER; FELIX, 2009). Essas moléculas são percebidas por receptores específicos, denominados de **PRRs** (Receptores de Reconhecimentos Padrões), que constituem o sistema imune da planta, assim essa percepção estimula a ativação de diversos sinais que resulta na primeira resposta de defesa, que é nomeada de **PTI** (imunidade desencadeada pelo patógeno) (Figura 3 – C) (BOLLER; FELIX, 2009).

Na segunda fase, os patógenos bem sucedidos produzem **efetores** que proporcionam o aumento da virulência e podem intervir na resposta da **PTI** (Figura 3 – E) (MACHO; ZIPFEL, 2014). As primeiras respostas por PTI são a produção (patógeno) ou indução (no hospedeiro) da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A partir de um fluxo de íons

pela membrana plasmática que ocasiona no disparo do metabolismo oxidativo, a produção de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) e expressão de genes relacionados à imunidade (BOLLER; FELIX, 2009).

Na terceira fase, os efetores são detectados pelas **PRRs** intracelulares, que reconhecem as moléculas introduzidas pelos patógenos, o que promove ativação de uma segunda resposta de defesa da planta que é a **ETI** (imunidade desencadeada pelo efector) (**Figura 3 – D**) (DODDS; RATHJEN, 2010). O reconhecimento pode ser direto ou indireto (JONES; DANGL, 2006). A resposta **ETI** é uma resposta **PTI** mais atenuada, proporcionando resistência ao patógeno, normalmente essa resposta induz morte celular na região da infecção (chamada de reação de hipersensibilidade ou HR) (DODDS; RATHJEN, 2010).

A quarta fase é a seleção natural, a qual o patógeno manobra o sistema ETI, a partir da eliminação ou modificação do efector ou até mesmo por elevação do nível desse efector, suprimindo o ETI (WIRTHMUELLER et al., 2013).

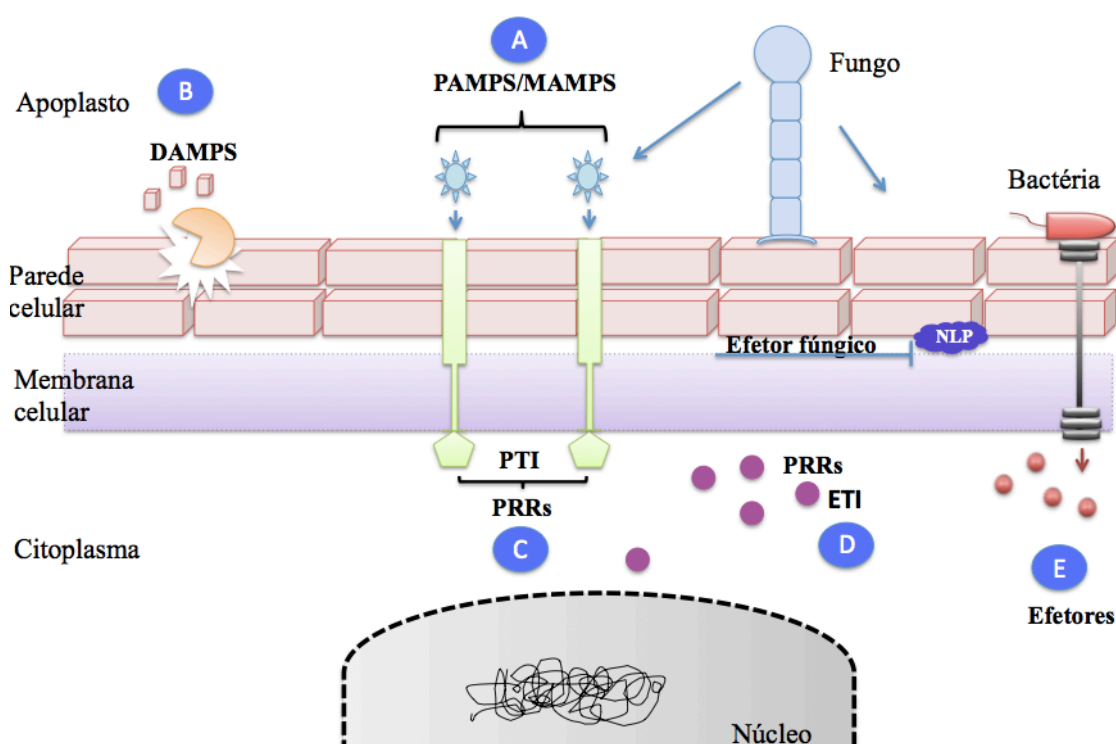


Figura 3. Aspectos gerais de parte dos processos moleculares que ocorrem durante uma interação planta-patógeno.

Durante essa disputa entre patógeno e hospedeiro, uma classe de moléculas, denominada de efetoras, é imprescindível tanto para a invasão do patógeno como para a defesa do hospedeiro. Moléculas efetoras são aquelas que interferem na estrutura e função de células hospedeiras, aumentando a eficiência microbiana (por fatores de virulência ou toxinas)

e/ou induzindo o sistema de defesa da planta (por fatores de avirulência ou elicitores) (KAMOUN, 2006; HOGENHOUT et al., 2009). Esses efetores podem ser de dois tipos, de acordo com os sítios distintos de reconhecimento na planta: (1) efetores apoplásticos - que são secretados nos espaços intercelulares das plantas, onde fazem a interação com receptores extracelulares e de superfície e (2) efetores citoplasmáticos- que são transportados ou secretados no interior da célula vegetal, por estruturas específicas, como vesículas e haustórios que realizam a invaginação dentro das células vivas do hospedeiro (KAMOUN, 2006).

Dentre as modificações fisiológicas mais comuns que ocorrem durante a interação patógeno-hospedeiro estão as mudanças na biossíntese de fitormônios. O etileno, ácido jasmônico (AJ) e ácido salicílico (AS) estão entre os hormônios que podem ser utilizados pelas plantas como sinais para desencadear mecanismos de resposta de defesa contra os organismos patogênicos. A sinalização mediada por etileno pode ser usada em resposta a patógenos, a ferimentos mecânicos e ferimentos induzidos por herbivoria. O aumento na concentração de ácido salicílico é um sinal importante relacionado com a resistência local e sistêmica a bactérias e a produção de ácido jasmônico é geralmente induzida em resposta a ferimentos mecânicos e ataques por herbivoria. As rotas de sinalização mediada por essas moléculas são complexas e podem exibir pontos de interligação. O que aumenta a complexidade para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nas respostas a infecção. Sabe-se, por exemplo, que a indução de apoptose celular pode utilizar simultaneamente a sinalização mediada por AJ, AS e etileno (TOMMA et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2014).

Como foi destacado no tópico anterior, dentre as doenças que afetam drasticamente a produção do cacau está a vassoura-de-bruxa causada pelo fungo *M. perniciosa*, e um sintoma característico da patologia é a necrose em regiões infectadas do tecido da planta, seguido de morte celular. É válido ressaltar que o agente etiológico da doença possui em seu genoma genes que codificam moléculas elicitoras de necrose e morte celular, como exemplo da família gênica das NLPs (proteínas do tipo Nep-Proteínas indutoras de Necrose e Etileno).

2.3 Família NLP e a relação com a patogenicidade

Dentre as inúmeras proteínas produzidas por alguns fitopatógenos, estão as indutoras

de necrose e etileno (NLP). Essas possuem em seus resíduos de aminoácidos regiões com alto grau de similaridade, constituindo assim uma família de proteínas de 24 a 26 kDa, cujas sequências estão presentes em uma diversa gama de organismos filogeneticamente não relacionadas (Figura 4).

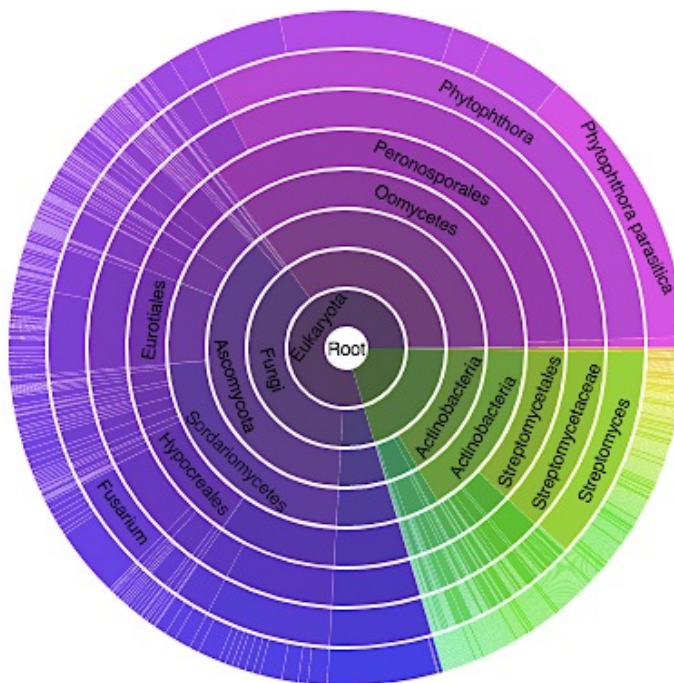


Figura 4. Representação gráfica simples da distribuição da família NLP entre diferentes espécies, fornecida pelo website PFAM (2018). Verde – grupo de bactérias; Roxo, azul e rosa - grupo de eucariotos (<http://pfam.xfam.org/family/NPP1#tabview=tab7>).

Bailey, em 1995, foi o primeiro a isolar a proteína NEP a partir de um experimento com filtrado da cultura do patógeno fúngico *Fusarium oxysporum*. Além disso, Bailey testou a proteína de 24 kDa, que ainda não havia sido nomeada, em tecido de uma variedade de plantas di e monocotiledôneas e verificou que os sintomas de necrose e aumento de produção de etileno eram observados apenas nas plantas dicotiledôneas. Posteriormente foi realizado o sequenciamento dessa proteína e constatado que não havia relação com nenhuma outra, e ou que seu domínio funcional ainda era desconhecido, sendo assim denominada Proteína Indutora de Necrose e Etileno (*Necrosis and Ethylene Inducing Protein* – NEP1 ou *NEP-like proteins NLPs*), fazendo parte do grupo de moléculas elicitoras (NELSON, 1998).

Muitos estudos vieram após a sua descoberta e foi verificada a presença de proteínas NLP nos mais diversos microrganismos procariotos e em eucariotos, como em bactérias gram-negativas (*Erwinia* spp., *Vibrio pommerensis*) (JORES et al., 2003;PEMBERTON; SALMOND, 2004), bactérias gram-positivas (*Bacillus halodurans*, *Streptomyces coelicolor*) (PEMBERTON; SALMOND, 2004), em oomicetos (espécies de *Phytophthora* sp., *Phytium*

sp. e *Hyaloperonospora arabidopsidis*) (PEMBERTON; SALMOND, 2004; CABRAL et al., 2012) e fungos (*Neurospora crassa*, *Moniliophthora perniciosa* e *Botrytis cinerea*) (GALAGAN et al., 2003; PEMBERTON; SALMOND, 2004; GARCIA et al., 2007; ARERAS et al., 2010;). Nem todos esses organismos são patógenos de plantas e variam no modo pelo qual ocasionam a doença.

Phytium aphanidermatum é um oomiceto que provoca o apodrecimento de caule e raiz de uma variedade de hospedeiros. Ottmann e colaboradores em 2009, resolveram a estrutura terciária da proteína NLP desse patógeno e revelaram a presença de um domínio único com uma dobra central β -sanduíche com três filamentos na primeira folha e uma segunda folha com cinco filamentos antiparalelos. Três α -hélices que rodeiam a segunda folha no topo do sanduíche, formando uma superfície plana. Além disso, possuíam regiões de alças (L1-L3) desestabilizadas com uma formação de ponte dissulfeto intramolecular entre dois resíduos de cisteínas conservados (Figura 5).

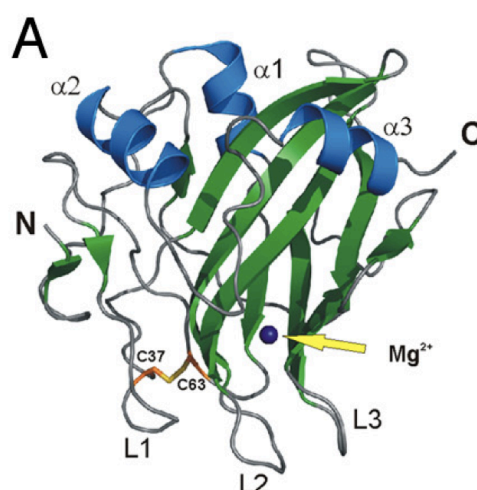


Figura 5. Proteína NLP de *Phytium aphanidermatum* cristalografada (NLP_{pya}). NLP_{pya} cristalografada com ligante íon divalente (Mg^{+2}), com estruturas α -hélices em azul, folhas- β em verde e os resíduos de cisteínas (OTTMANN et al., 2009).

Ottmann e colaboradores (2009) também demonstraram que proteínas NLP_{pya} mutadas em resíduos de aminoácidos altamente conservados, diminuem ou não causam necrose quando infiltradas em folhas de tabaco. O que sustenta a ideia de Fellbrich e colaboradores (2002) que os resíduos conservados dessa família de proteínas podem ser importantes para a sua atividade. No entanto, microrganismos como *Streptomyces coelicolor* e *Bacillus halodurans* que produzem proteínas NEP e possuem o domínio conservado intacto, não apresentam atividade fitotóxica (GIJZEM; NURNBERGER, 2006).

Todas as NLPs possuem o domínio NPPI (Necrosis-Inducing Phytophthora Protein) e foram classificadas de acordo com a quantidade de resíduos de cisteínas nessa região, apresentando o tipo I duas cisteínas e tipo II quatro cisteínas (GIJZEM; NURNBERGER, 2006). Ademais, independentemente do tipo I ou II, essas proteínas possuem um heptapeptídeo (GHRHDWE) conservado na região central desse domínio e contém com raras exceções, sequências de peptídeos sinal N-terminal sinalizando sua secreção, sugerindo seu funcionamento na região extracelular (GIJZEM; NURNBERGER, 2006).

Oome e Ackerveken em 2014 descreveram um terceiro tipo de NLP, que se diferencia das demais nas sequências N- e C- terminais, onde possui seis resíduos de cisteínas. O tipo III foi detectado apenas em espécies de fungos ascomicetos, o que propõe que o gene que codifica essa proteína tenha tido origem evolutiva nesse filo (OOME; ACKERVEKEN, 2014).

Os genes que codificam as proteínas NLPs podem apresentar expressão diferenciada durante a infecção. O oomiceto *Phytophthora sojae*, um patógeno hemibiotrófico que provoca podridão na raiz e caule da soja, possui o gene que codifica PsojNIP que tem sua expressão apenas nos estágios finais da infecção, ou seja, na mudança para fase necrotrófica (QUTOB; KAMOUN; GIJZEM, 2002). Já o fungo *Moniliophthora perniciosa*, o causador da vassoura-de-bruxa, possui mais de um gene que codifica a NLP, que são expressos diferencialmente durante a fase biotrófica e saprofítica (GARCIA, et al. 2007). Tiburcio e colaboradores (2010) sugerem que esses genes foram adquiridos por meio de transmissão horizontal de oomicetos.

Os mecanismos pelos quais as NLPs provocam sintomas de necrose e, ou aumento de etileno ainda não estão elucidados, no entanto muitos trabalhos *in silico* e *in vivo* sugerem como essas proteínas podem desencadear a resposta imune de plantas. Bailey e colaboradores (1997) haviam proposto que a necrose poderia ser provocada devido ao aumento dos níveis de etileno, mas já havia sido constatado a NLP induzindo necrose sem o aumento de etileno. Assim outros mecanismos podem estar envolvidos no modo de ação dessas proteínas (BAILEY, 1995; BAILEY et al., 1997).

Dentre os processos envolvidos na resposta de plantas às NLPs estão a ativação de MAP quinase, indução de fluxos iônicos, acumulação de fitoalexinas e espécies reativas de oxigênio (ROS), respiração celular modificada, aposição de calos e indução de genes relacionados ao sistema de defesa (JENNINGS et al., 2001; FELLBRICH et al., 2002; KEATES et al., 2003; PEMBERTON; SALMOND, 2004). Uma resposta semelhante ao que é desencadeado por PAMP, porém a morte celular elicitada por NLP é geneticamente diferente

ao tipo de resposta de hipersensibilidade (HR) (QUTOB et al., 2006).

Nas plantas *Arabidopsis thaliana*, *Centaurea maculosa* e *Taraxacum officinale* tratadas com NLP, foram verificadas modificações na camada de cutícula e estruturas internas da membrana do cloroplasto, como também o aumento da expressão de vários genes relacionados às respostas de estresse em plantas, como de ferimento, seca, senescência e resistência a doença (KAETS et al., 2003). A produção de ácido salicílico parece também ser uma resposta de defesa de *Arabidopsis* à NLP (FELLBRICH et al., 2002).

Kufner e colaboradores em 2009 propuseram que as proteínas NLPs são fatores de virulência que são reconhecidos pela planta devido às alterações celulares induzidas por danos na membrana, como liberação de elicitores endógenos (dos hospedeiros) ou mudanças na homeostase dos íons. E que essas moléculas realizam a mediação da ruptura da membrana facilitando a morte celular. Essa hipótese de que as NLPs atuam como toxinas citolíticas e que invadem as membranas sem intermédio ativo da célula vegetal foi sustentada por Arenas e colaboradores (2010) em seu trabalho com BcNEP1 e BcNEP2 de *Botrytis cinerea*. Samanthanam e colaboradores (2013) em um estudo com NLPs de *Verticillium dahliae* demonstraram a diversidade funcional dentro dessa família de proteínas, onde a deleção direcionada de *NPL1* no genoma do fungo comprometeu a virulência em várias plantas e ainda afetou diretamente no seu crescimento e esporulação. Todavia, a deleção direcionada de *NLP2* não resultou comprometimento significativo da virulência em *Nicotiana benthamiana*. Assim, as proteínas NLP1 e NLP2 desse patógeno apresentam uma diversificação funcional porque a citotoxicidade entre os membros tem contribuições diferentes quanto à virulência.

A contribuição na virulência é vista também em *HaNLP* do patógeno *Hyaloperonospora arabidopsidis*, onde a superexpressão desse gene, durante a infecção em *Arabidopsis thaliana*, aumenta a suscetibilidade à doença e consequentemente diminui o desenvolvimento da planta (OOME et al., 2014). Além disso, os fragmentos das proteínas HaNLP3 são suficientes para induzir a redução do crescimento de plantas, e essas proteínas após desnaturação durante 1h, induzem três vezes mais etileno do que as proteínas nativas, sugerindo que o seu epítipo imunogênico não está totalmente exposto na proteína nativa (OOME et al., 2014).

Recentemente em um estudo com NLPs de *Magnaporthe oryzae* também relacionou a expressão desses genes com a virulência em plantas. *M. oryzae* é um patógeno fúngico causador da brusone do arroz e possui em seu genoma quatro cópias do gene NLPs (MoNLP1-4). Fang; Peng e Fan (2017) verificaram que a expressão de MoNLPs induz a

produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a morte celular em tecidos de *Nicotiana benthamiana*. Entretanto, o nocaute da família desses genes no fungo não comprometeu sua infecção no arroz, seu crescimento e esporulação (FANG; PENG e FAN, 2017), portanto não parecem ser essenciais para infecção de plantas monocotiledôneas e desenvolvimento do fungo.

Como pôde ser visto nos trabalhos descritos, as características morfofuncionais variam conforme o patossistema, o que dificulta o estabelecimento de um mecanismo de ação dessas proteínas, que são tão diversificadas em uma ampla gama de organismos distintos.

2.4 Nep em *Moniliophthora perniciosa*

No banco genômico de *M. perniciosa* foram identificados alvos importantes para a compreensão do desenvolvimento da vassoura-de-bruxa no *T. cacao*. Dentre os quais estão as cinco sequências de DNA que codificam proteínas indutoras de necrose e etileno (NLPs) que foram denominadas MpNep 1-5 (GARCIA et al., 2007; MONDENGUO et al., 2008). Sendo que todos os genes de MpNeps estão localizados em um mesmo cromossomo (GARCIA et al., 2007). *MpNeps* possuem expressão diferenciada durante o desenvolvimento do fungo na infecção (GARCIA et al., 2007). O nível de expressão de *MpNep2*, por exemplo, aumenta juntamente com a progressão dos sintomas de necrose, alcançando o nível máximo no estágio necrotrófico avançado, no qual os sintomas da vassoura seca são perceptíveis. Portanto, a MpNEP2 pode ser a principal isoforma associada a necrose do cacau durante a vassoura-de-bruxa. Devido a essa associação, MpNEP2 teve sua estrutura cristalográfica resolvida para melhor compreender suas características. Essa proteína possui em sua estrutura uma cavidade com carga fortemente negativa, formada entre folhas β de cinco filamentos, além de alças entre as estruturas α hélices e o domínio “GHRHDWE” que caracteriza a família (ZAPAROLI et al., 2011) (Figura 6). Mutação sítio dirigida nessa região conservada comprometeu a atividade da proteína, mostrando ser uma região importante para seu funcionamento (ZAPAROLI et al., 2011). Outra propriedade interessante em sua estrutura é a termoestabilidade, ou seja, após ser submetida a uma alta temperatura consegue renaturar e restabelecer a sua atividade (GARCIA et al., 2007).

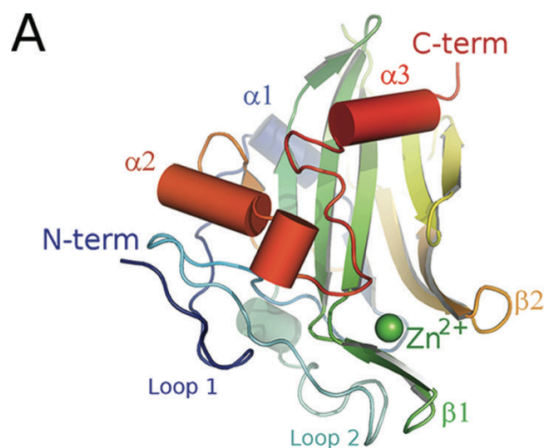


Figura 6. Proteína MpNEP2 cristalografada. MpNep2 cristalografada com ligante íon divalente (Zn^{+2}). Região N- terminal em azul e C- terminal em vermelho (ZAPAROLI et al, 2011).

A MpNEP2 demonstrou alta identidade estrutural com a primeira NLP_{pya} cristalografada em fungo (OTTAMNN et al., 2009). No entanto, a atividade predita de MpNEP2 não foi dependente de íon como na NLP_{pya}, em que foi verificado que o íon cátion divalente é fundamental para a sua atividade citolítica (OTTAMANN et al., 2009; ZAPAROLI et al., 2011). Quanto a relação dessas proteínas com a patogenicidade, a MpNEP1 e MpNEP2 foram capazes de induzir necrose e emissão de etileno em folhas de tabaco e cacau (GARCIA et al., 2007). Uma alternativa para reduzir os sintomas causados por essas proteínas foi testada em plantas transgênicas com alta atividade de FvOXDC (oxalato desidrogenase), que mostraram maior resistência a MpNEP2 em relação as plantas controles (SILVA et al., 2011). Sugere-se que a geração de ROS induzidas por oxalato e NLP seja um mecanismo chave que ativa a morte celular programada por uma via dependente de conversão de oxalato em H_2O_2 (SILVA et al., 2011). Uma possível hipótese para MpNEP2 é a existência de um reservatório de dímeros dessa proteína sob forma inativa no apoplasto do hospedeiro infectado pela *M. pernicioso*. Os autores sugerem que os heptapeptídeos estejam escondidos pela interface de interação MpNEP2-MpNEP2, e que após o aumento da temperatura ou outros estresses abióticos isso acarretaria em uma desagregação do dímero, levando à exibição dos heptapeptídeos ativando a sua função proteica (OLIVEIRA et al., 2012).

Plantas de *Nicotiana benthamiana* induzidas com MpNEP2, tiveram a regulação negativa de proteínas associadas a glicólise, que possivelmente prejudica a biossíntese do ATP e favorece a morte celular. Destarte, esse elicitor induz modificações no metabolismo da célula vegetal, da respiração aeróbica, fermentação anaeróbica, reduzindo a produção de ATP, dando total permeabilidade da membrana plasmática, ocasionando a necrose (VILLELA-

DIAS et al., 2014). Além disso, a presença de proteínas MpNEP2 no cacau podem induzir morte celular programada (PDC) a partir da ativação de proteases (SANTANA et al., 2014).

Muitos trabalhos vêm tentando elucidar os mecanismos pelos quais MpNeps atuam, no entanto ainda não está claro como de fato essas proteínas causam necrose em células hospedeiras. Estudos de interação desses elicitores com alvos moleculares de células vegetais pode ser um caminho para esclarecer essas questões.

3. REFERÊNCIAS

AGRIANUAL. Anuário da agricultura brasileira. São Paulo. 2004 (Consultoria & Comércio).

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

ALMEIDA, D. S. M. **Estudos funcionais de fatores de transcrição envolvidos na interação *Theobroma cacao*- *Moniliophthora perniciosa***. 2016. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, BA.

ALMEIDA, O. C., CHIACCHIO, F. P. B.; ROCHA, H. M. Sobrevivência de *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer em vassouras secas de cacaueiros (*Theobroma cacao* L.) do estado da Bahia. **Agrotrópica**. 9, 23–28, 1997.

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

ARENAS, Y. C. et al. Functional analysis and mode of action of phytotoxic Nep1-like proteins of *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 74, 376-386, 2010.

ARGOUT, X. et al. The genome of *Theobroma cacao*. **Nature Genetics** 43, 101–108, 2011.

BAILEY, B. A. "Purification of a Protein from Culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that Induces Ethylene and Necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*." **Phytopathology**. 85, 1250-1255, 1995.

BAILEY, B. A.; JENNINGS, J. C.; ANDERSON, J. D. The 24-kDa protein from *Fusarium oxysporum* f. sp. *erythroxyl*i: occurrence in related fungi and the effect of growth medium on its production. **Canadian Journal of Microbiology**. 43, 45–55, 1997.

BARAU, J. et al. Apoplastic and intracellular plant sugars regulate developmental transitions in witches' broom disease of cacao. **Journal of Experimental Botany**, 66, 1325–37, 2015.

BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology**. 34, 306 –312, 1985.

BEG, M. S.; AHMAD, S.; JAN, K.; BASHIR, K. Status, supply chain and processing of cocoa - A review. **Trends in Food Science & Technology**. 66, 108-116, 2017.

BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995.

BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review Plant Biology**. 60, 379–406, 2009.

CABRAL, A. et al. Nontoxic Nep1-like proteins of the downy mildew pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis*: repression of necrosis-inducing activity by a surface-exposed region. **Molecular Plant Microbe Interact**. 25, 697–708, 2012.

CALLE, H.; COOK, A. A.; FERNANDO, S. Y. Histology of witches' broom caused in cacao (*Theobroma cacao*) by *Crinipellis pernicioso*. **Phytopathology**. 72, 1479-1481, 1982.

CEITA, G.O.C.; MACÊDO, J.N.A.; SANTOS, T.B et al. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora pernicioso* . **Plant Science**. 173, 106-117, 2007.

CHEESMAN, E. E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. **Trop Agricult**. 21, 144–159, 1944.

DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**. 11, 539–548, 2010.

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

FANG, YA-LI; PENG, YOU-LIANG; FAN, JUN. The Nep1-like protein family of *Magnaporthe oryzae* is dispensable for the infection of rice plants. **Scientific Reports**. 7, 4372, 2017.

FELLBRICH G, et al. NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. **The Plant Journal**. 32, 375–390, 2002.

FRIAS, G. A.; PURDY, L. H.; SCHMIDT, R.A. Infection biology of *Crinipellis–Pernicioso* on vegetative flushes of cacao. **Plant Disease**. 75, 552–556, 1991.

GALAGAN, J. E.; CALVO, S. E.; BIRREN, B. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature**. 422, 859–868, 2003.

GARCIA O et al. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. **Mycological Research** 111, 443–455, 2007.

GIJZEN, M.; NURNBERGER, T. Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. **Phytochemistry**. 67, 1800-18007, 2006.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom

- pathogen of cocoa, *Crinipellis perniciosus*. **Heredity**. 72, 278–289, 1994.
- GRIFFITH, G.W. et al. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. **New Zealand Journal Botany**. 41, 423–435, 2003.
- HEBBAR, P. K. Cacao diseases: A global perspective from an industry point of view. **Phytopathology**, 97, 1658-1663, 2007.
- HEDGER, J. N., PICKERING, V.; ARAGUNDI, J. A. Variability of populations of the witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosus*). **Transactions British Mycological Society**. 88, 533–546, 1987.
- HOGENHOUT, S.A et al. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. **Molecular Plant Microbe Interactions**, 22, 115-122, 2009.
- HOLLIDAY, P. **Fungus Diseases of Tropical Crops**. New York: Dover Pub. Inc. 1980
- JENNINGS, J. C. et al. Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep1 from *Fusarium oxysporum*. **Plant Science**. 161, 891–899, 2001.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, 444, 323–9, 2006.
- JORES, J., APPEL, B., LEWIN, A. Cloning and molecular characterization of a unique hemolysin gene of *Vibrio pommerensis* sp. nov.: development of a DNA probe for the detection of the hemolysin gene and its use in identification of related *Vibrio* spp. from the Baltic Sea. **FEMS Microbiology Letters**. 229, 223–229, 2003.
- KAMOUN, S. "A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes." **Annual Review of Phytopathology**. 44, 41-60, 2006.
- KEATES, S. E. et al. Altered gene expression in three plant species in response to treatment with Nep1, a fungal protein that causes necrosis. **Plant Physiology** 132, 1610–1622, 2003.
- KEREKES, J. F.; DESJARDIN, D. E. A monograph of the genera *Crinipellis* and *Moniliophthora* from Southeast Asia including a molecular phylogeny of the nrITS region. **Fungal Diversity**. 37, 101-152, 2009.
- KILARU, A; HASENSTEIN, K. H. Development and pathogenicity of the fungus *Crinipellis perniciosus* on interaction with cacao leaves. **Phytopathology**. 95, 101-107, 2005.
- KUFNER, I. et al. Cytolytic toxins as triggers of plant immune response. **Plant Signal Behavior**. 4, 977–979, 2009.
- LAWRENCE, J. S.; CAMPÊLO, A. M. F. L.; FIGUEIREDO, J. M. Enfermidades do cacaueiro. II—Doenças fúngicas que ocorrem nas folhas, ramos e tronco. **Agrotrópica**, 3, 1–14, 1991.
- MACHO, A. P; ZIPFEL, C. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. **Molecular Cell**. 54, 263-272, 2014.
- MEINHARDT, L. W. et al. Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal

pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. **BMC Genomics**. 15, 164, 2014.

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

MICHEREFF, S. J. **Epidemiologia de Doenças de Plantas**. Lab. Fundamentos de Fitopatologia. Recife, PE. 2001.

MONDEGO, J. M. C. et al. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches Broom Disease of cacao. **BMC Genomics**. 9, 548, 2008.

MOTAMAYOR, J. C. et al. Cacao domestication I : the origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity**, 89, 380–386, 2002.

MOTAMAYOR, J. C. The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. **Genome Biology**, 14, 53, 2013.

NELSON, A. J.; APEL-BIRKHOLD, P. C.; BAILEY, B.A. Sequence announcements. **Plant Molecular Biology**. 38, 911-912, 1998.

OLIVEIRA, G. A. P. et al. *Moniliophthora perniciosa* Necrosis- and Ethylene-Inducing Protein 2 (MpNep2) as a Metastable Dimer in Solution: Structural and Functional Implications. **PLoS ONE** 7, 45620, 2012.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. **Identificação e manejo das principais doenças do cacau no Brasil**. In Ciência e Tecnologia do Cacau. Editor, R.R. Valle. Gráfica e Editora Vital Ltda. 123-151, 2007.

OOME, S.; ACKERVEKEN, G. V. Comparative and Functional Analysis of the Widely Occurring Family of Nep1-Like Proteins. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 27, 1081–1094, 2014.

ORCHARD, J. E.; HARDWICK, K. **Photosynthesis, carbohydrate trans- location and metabolism of host and fungal tissues in cocoa seedlings infected with *Crinipellis perniciosa***. Lagos, Nigeria: Cocoa Producers Alliance. 1988.

OTTMANN, C. A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 106, 10359-10364, 2009

PEMBERTON, C. L., SALMOND, G. P. The Nep1-like proteins: a growing family of microbial elicitors of plant necrosis. **Molecular Plant Pathology**. 5, 353–359, 2004.

PENMAN, D., BRITTON, G., HARDWICK, K., COLLIN, H.A. AND ISAAC, S. Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Mycological Research**. 104, 671– 675, 2000.

PEREIRA, J. L. et al. Primeira ocorrência da vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotópica**. 1, 70-81, 1989.

- PRIDMORE, R. D. et al. Genomics, molecular genetics and the food industry. J. **Biotechnol.** 78, 251–258, 2000.
- QUTOB, D. et al. Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. **Plant Cell.** 18, 3721-44, 2006.
- QUTOB, D., KAMOUN, S.; GIJZEN, M. Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. **Plant Journal** 32, 361-373, 2002.
- RESENDE, M.L.V. et al. *Crinipellis pernicioso* proveniente de um novo hospedeiro, *Heteropterys acutifolia*, é patogênico a *T. cacao*. **Fitopatologia Brasileira.** 25, 88–91, 2000.
- RUSCONI, M.; CONTI, A. *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: a scientific approach beyond myths and claims. **Pharmacological research.** 61, 5–13, 2010.
- SANTHANAM, P. et al. Evidence for Functional Diversification Within a Fungal NEP1-Like Protein Family. **Molecular Plant-Microbe Interactions.** 26, 278–286, 2013.
- SANTANA, L. S. et al. *TcCYS4*, a cystatin from cocoa, reduces necrosis triggered by *MpNEP2* in tobacco plants. **Genetics and Molecular Research.** 13, 7636-7648, 2014.
- SCARPARI, L. M. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. **Journal of Experimental Botany.** 56, 865-877, 2005.
- SENA, K. F.; ALEMANNO, L.; GRAMACHO, K. P. The infection process of *Moniliophthora pernicioso* in cacao. **Plant Pathology.** 63, 1272-1281, 2014.
- SILVA, L. F. et al. Expression of an oxalate decarboxylase impairs the necrotic effect induced by Nep1-like Protein (NLP) of *Moniliophthora pernicioso* in transgenic tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interactions.** 24, 839-848, 2011.
- SISTEMA IBGE de Recuperação Automática –SIDRA: Levantamento Sistemático da Produção Agrícola 2018. Disponível: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>. Acesso em: out. 2018.
- SOUZA, J. T. et al. Cocoa diseases: witches' broom. UMAHARAN, P. (ed.), **Achieving sustainable cultivation of cocoa**, Burleigh Dodds Science Publishing, Cambridge, UK, 2018.
- TEIXEIRA, P. J. P. L. et al. High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora pernicioso*. **Plant Cell.** 26, 4245–69, 2014.
- TEIXEIRA, P. J. P. L.; THOMAZELLA, D. P. D T., PEREIRA, G. A. G. Time for Chocolate: Current Understanding and New Perspectives on Cacao Witches' Broom Disease Research. **Plos Pathogen.** 11, 10, 2015.
- THOMAS, E. et al. Present spatial diversity patterns of *Theobroma cacao* L. in the neotropics reflect genetic differentiation in pleistocene refugia followed by human-influenced dispersal. **PLoS one.** 7, 2012.

- THOMAZELLA, D. P. T. et al. The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. **New Phytologist**, 194, 1025–34, 2012.
- THOMMA, B. P. H. J. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. **Current Opinion in Immunology**.13, 63–68, 2001.
- TIBURCIO, R. A. et al. Genes acquired by horizontal transfer are potentially involved in the evolution of phytopathogenicity in *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri*, two of the major pathogens of cacao. **Journal of Molecular Evolution**.70, 85-97, 2010.
- VILLELA-DIAS, C. et al. Nep1-like protein from *Moniliophthora perniciosa* induces a rapid proteome and metabolome reprogramming in cells of *Nicotiana benthamiana*. **Physiologia Plantarum**. 150, 1–17, 2014.
- WICKRAMASURIYA, A. M.; DUNWELL, J. M. Cacao biotechnology: current status and future prospects. **Plant Biotechnology Journal**.16, 4–17, 2018.
- WIRTHMUELLER, L.; MAQBOOL, A.; BANFIELD, M. J. On the front line: structural insights into plant–pathogen interactions. **Nature Reviews, Microbiology**. 11, 2013.
- ZADOKS, J. C.; SCHEIN, R. D. Epidemiology and plant disease management. New York: Oxford University Press, 1979.
- ZAPAROLI, G. et al. The crystal structure of Necrosis- and Ethylene-Inducing Protein 2 from the causal agent of cacao’s witches’ broom disease reveals key elements for its activity. **Biochemistry**.50, 9901–9910, 2011.
- ZIPFEL, C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. **Current opinion in immunology**.20, 10–6, 2008.
- ZIPFEL, C. Plant pattern-recognition receptors. **Trends in Immunology**. 35, 7, 2014.

4. CAPÍTULO 1

Identificação de potenciais alvos de *Theobroma cacao* na interação com MpNEP2 do fungo causador da vassoura-de-bruxa

Maria Luíza do Carmo Santos, Natasha dos Santos Lopes, Monaliza Macedo Ferreira, Geiseane Veloso Amaral, Cristiano Villela Dias, Carlos Priminho Pirovani, Fátima Cerqueira Alvim

Manuscrito em construção.

Identificação de potenciais alvos de *Theobroma cacao* na interação com MpNEP2 do fungo causador da vassoura-de-bruxa

Maria Luíza do Carmo Santos, Natasha dos Santos Lopes, Monaliza Macedo Ferreira, Geiseane Veloso Amaral, Cristiano Villela Dias, Carlos Priminho Pirovani, Fátima Cerqueira Alvim

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

*Autor correspondente: Fátima Cerqueira Alvim, UESC, DCB, Rodovia Ilhéus-Itabuna km16, 45662-900, Ilhéus-BA, Brazil. Phone: +55 73 3680-5434. Fax: +55 73 3680-5226. E-mail: alvim@uesc.br

Abreviaturas: NLP: *Nep-like proteins*; NEP: proteínas indutoras de necrose e etileno; MpNEP2: proteínas indutoras de necrose e etileno de *Moniliophthora perniciosa*

Palavras-chave: *M. perniciosa*, MpNEP2, morte celular, docking molecular

RESUMO

As proteínas Nep-like ou indutoras de necrose e etileno são moléculas efetoras de microrganismos capazes de induzir morte celular em tecidos vegetais e/ou biossíntese de etileno. Sua sequência está distribuída amplamente em diversos grupos de microrganismos associados às plantas. *Moniliophthora perniciosa*, fungo causador da doença vassoura-de-bruxa do *Theobroma cacao*, possui cinco cópias do gene (*MpNep1-5*) que codificam essas proteínas, dentre esses ocorre maior expressão de *MpNep1* e *2* durante o desenvolvimento da doença, especialmente na necrose. Embora muito estudadas, pouco se conhece sobre os mecanismos pelos quais essas proteínas induzem morte celular. Nesta perspectiva o presente estudo objetivou comparar sequências de NEP presentes em *M. perniciosa*, identificar potenciais proteínas alvo da MpNEP2 em extratos ativos de *Theobroma cacao* (CCN51 e Catongo) e propor, a partir dos resultados alcançados, mecanismos pelos quais MpNEP2 pode desencadear morte celular. Neste estudo mostramos com análises *in silico* a presença de regiões preditas conservadas entre MpNEPs 1-5, com diferentes sítios de fosforilação e N-glicosilação, apenas para MpNEPs 1 e 5. Presença de peptídeo sinal (MpNEP1-3), ponto isoelétrico variável (5.79-8.51), peso molecular característico da família NLP (24-26kDa) e localização celular vacuolar, exceto MpNEP2 prevista em estudos anteriores como extracelular. Ademais essas sequências possuem trechos putativos intrinsecamente desordenados, podendo ser domínios de ligação de proteínas. Alvos moleculares capturados *in vitro* por rMpNEP2 foram identificados como metalo hidrolase oxidoreductase, fator de resposta a auxina, esfingosina quinase, proteína tipo formina, superfamília de proteínas ENTH ANTH VHS e beta-hidroxisteroide desidrogenase. Essas proteínas participam de processos importantes no metabolismo primário, função molecular e na regulação de resposta da planta. E essas interações dos alvos identificados com MpNEP2 foram validadas *in silico*. Discutimos as diferentes vias de sinalização hormonal, modulação da membrana e citoesqueleto da célula, regulação endocítica com receptores de reconhecimento, pelas quais MpNEP2 podem atuar e induzir respostas na planta para uma possível necrose.

1. INTRODUÇÃO

As plantas ao longo da evolução desenvolveram um sistema de proteção complexo de múltiplas barreiras que reconhecem e impedem invasões de diversos microrganismos patogênicos (DODDS; RATHJEN, 2010). Na primeira fase de interação com o patógeno, a planta realiza o reconhecimento de moléculas associadas ao patógeno ou padrões moleculares associados a microrganismos (PAMPS/MAMPS) por receptores de reconhecimento padrões (PRRs) que estão sobre a superfície das células vegetais ou no apoplasto (KAMOUN, 2006; BOLLER; FELIX, 2009). Neste local, é estimulado a ativação de diversos sinais que resultam na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), intumescimento de paredes celulares, regulação positiva de genes relacionados a defesa e acúmulo de compostos antimicrobianos, que proporcionam, concomitantemente, resistência da planta à patógenos adaptados e não adaptados (MACHO; ZIPFEL, 2014). Os patógenos que ultrapassam essa primeira barreira, liberam moléculas efetoras que elevam a sua virulência e estimulam uma segunda resposta de defesa da planta, que é mais atenuada que a primeira e geralmente induz morte celular dos tecidos infectados, desencadeando a doença (HOGENHOUT et al., 2009; WIRTHMUELLER et al., 2013).

Dentre milhares de patógenos que provocam doenças em plantas, ocasionando perdas severas na produção agrícola, está o fungo *Moniliophthora perniciosa* (Mp) que é o agente etiológico da vassoura-de-bruxa do *Theobroma cacao*, considerada economicamente a segunda patologia mais danosa do cacaueiro (SOUZA et al., 2018). Um sintoma característico desta doença é a necrose em tecidos infectados, seguido de morte celular. Mp possui em seu genoma cinco sequências de genes que codificam proteínas Nep-like ou proteínas indutoras de necrose e etileno (NEP ou NLP), das quais MpNEP2 é mais expressa durante o estágio avançado da necrose da vassoura-de-bruxa (ZAPAROLI et al., 2011).

NLP compreende uma família de elicitores microbianos com tamanho de 24 a 26 kDa que induzem necrose em plantas (PEMBERTON; SALMOND, 2004). Essas proteínas estão presentes em uma diversa gama de microrganismos taxonomicamente não relacionados, que compartilham um domínio NPP1 conservado. O primeiro membro a ser descrito foi em 1995 por Bailey o qual isolou a proteína de um filtrado da cultura de *Fusarium oxysporum* e a mesma foi capaz de induzir necrose e etileno em plantas dicotiledôneas, mas não em monocotiledôneas. Desde então diversos estudos mostram, entre diferentes organismos, divergência no número de cópias de NLPs, bem como nas respostas ocasionadas pelos

hospedeiros, o que dificulta o estabelecimento de um mecanismo pelo qual é induzida a morte celular.

Das MpNEPs produzidas por Mp, tanto MpNEP1 quanto MpNEP2 são capazes de induzir necrose e biossíntese de etileno em folhas de tabaco e cacau (GARCIA et al., 2007). Porém, plantas transgênicas com alta atividade de FvOXDC (oxalato desidrogenase), demonstram maior resistência a MpNEP2, propondo que a geração de ROS induzida pode ser proveniente de uma via de oxalato e NLP que ativa a morte celular programada (SILVA et al., 2011). Além disso, acredita-se que em interação Mp:*T. cacao*, o patógeno possui um reservatório de MpNEP2 no apoplasto do hospedeiro em uma isoforma dimérica (MpNEP2-MpNEP) inativa, que após algum estresse abiótico provoca a separação do dímero levando a exposição de domínios importantes para sua função (OLIVEIRA et al., 2012). Adicionalmente estudo com plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas com MpNEP2 mostraram regulação negativa de proteínas associadas a glicólise, que provavelmente prejudica a biossíntese de ATP e favorece a morte celular (DIAS et al., 2014). Ainda, é possível que morte celular programada do cacau possa ser induzida por MpNEP2 a partir da ativação de proteases (SANTANA et al., 2014).

Associado ao patossistema da vassoura-de-bruxa com *T. cacao*, muitos trabalhos vêm tentando elucidar a ação de MpNEP2 e sua contribuição para o avanço da doença, no entanto ainda não está muito claro como de fato essas proteínas induzem necrose em células hospedeiras. Nesta perspectiva, realizamos análises *in silico* de comparação das sequências de MpNEPs do fungo da vassoura-de-bruxa, capturamos e identificamos *in vitro* potenciais alvos moleculares de MpNEP2 em células de *T. cacao* e validamos as possíveis interações por *docking*. Desse modo, contribuímos com novas informações sobre as diferentes vias por quais as MpNEP2s podem atuar e induzir morte celular no hospedeiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Análises de sequências das proteínas MpNEPs

As sequências dos genes NLPs (NEP1 - EF109894.1; NEP2 - EF114673.1; NEP3 - EF164925.1; NEP4 - JN545833.1; NEP5 - JN545834.1) de *M. perniciosa* foram obtidas a

partir de banco de dados disponível na plataforma NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), em que foi realizado BLASTp para obtenção das sequências de resíduos de aminoácidos correspondentes.

A fim de verificar as diferenças e similaridades entre NLPs do fungo *M. pernicioso*, cinco sequências de resíduos de aminoácidos das proteínas foram alinhadas e comparadas, quanto as modificações pós-traducionais, localização celular e identificação de regiões desordenadas.

O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado a partir do servidor *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). As predições pós-traducionais foram realizadas utilizando *softwares online* SignalP 4.1 (PETERSEN et al., 2011) para presença ou ausência de peptídeo sinal, NetNGlyc (GUPTA; JUNG; BRUNAK, 2004) para sítios de glicosilação, NetPhos 2.0 (BLOM; GAMMELTOFT; BRUNAK, 1999) para sítios fosforilados e NetAcet 1.0 (KIEMER; BENDTSEN; BLOM, 2005) para sítios acetilados, cujos servidores são fornecidos pelo ExPASy. Além disso, o peso molecular, ponto isoelétrico e regiões de desordem foram preditos em Compute pI/Mw (GASTEIGER et al., 2005) e PODR® (ROMERO et al., 1997). A análise de localização celular foi predita utilizando o programa MultiLoc2-HighRes (<https://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc2>) (BLUM; BRIESEMEISTER; KOHLBACHER, 2009).

2.2 Obtenção de proteína indutora de necrose e etileno (rMpNEP2) e teste de viabilidade

Proteínas indutoras de necrose e etileno de *M. pernicioso* (MpNEP2) foram obtidas, purificadas e liofilizadas a partir do vector pET28A (recombinante) em *Escherichia coli* BL21(DE3), produzido por Dias-Villela e colaboradores, 2013.

Teste de viabilidade foi realizado com a proteína rMpNEP (MpNEP recombinante) para observar sua atividade de necrose em folhas de *Nicotiana tabacum*. A proteína purificada liofilizada foi ressuspensa em água ultrapura (2 mL) e infiltrada com a pipeta em ferimentos pré-formados na superfície adaxial da folha, sendo utilizado como controle a infiltração apenas de água ultrapura.

2.4 Extração de proteínas nativas totais

Para captura dos potenciais alvos que interagem com MpNEP2 foi necessário a extração de proteínas nativas totais de extrato de *Theobroma cacao* de variedades contrastantes. Para tanto, foi realizado a extração de proteínas nativas totais de folhas e ramos em genótipos CCN51 (resistente) e Catongo (suscetível), com 1g de material vegetal macerado e homogeneizado em 5 mL de Tampão de Extração (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, Triton X-100 1%), agitado sobre o vortex por 10 min e preservada em gelo. As amostras foram sonicadas (8 pulsos de 3 s cada com intervalos de 10 s com amplitude 70%) e centrifugadas a 15000xg durante 20min a 4°C. O precipitado foi submetido à uma segunda extração, ao passo que no sobrenadante obtido foram adicionados 0,4 volumes de Tert-Butanol e 1/10 de NaAc à 3M pH 4,5. As amostras foram mantidas em gelo por 30 min, com agitação a cada 10 min em vortex e posteriormente centrifugadas à 15000xg por 10 min a 4°C, obtendo o sobrenadante com proteínas totais em condições nativas (PIROVANI et al, 2008). As amostras contendo proteínas totais foram estocadas a 4°C para posterior captura a partir de rMpNEP2 acoplada à sepharose ativada com CNBr.

2.5 Captura de proteínas de folhas e ramos de *Theobroma cacao* a partir de rMpNEP2 acoplada à Sepharose-CNBr

Para a montagem do sistema de captura de proteínas alvo foi preciso efetuar o acoplamento de MpNEP2 recombinante (ligante) à Sepharose™ 4 Fast Flow (GE Healthcare) ativada com CNBr, de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente foi realizado teste de validação da eficiência do acoplamento utilizando membrana de nitrocelulose. Em membrana de nitrocelulose de 2 x 5 cm foi pipetado 2 µl do ligante em tampão de acoplamento antes do contato com a resina e 2 µl do sobrenadante após o contato com a resina. A membrana foi submetida ao corante Ponceau. Após o teste, proteínas alvo foram capturadas.

A captura de proteínas de *T. cacao* (Catongo e CCN51) foi realizada com a incubação da resina por 40 min em temperatura ambiente, sob leve agitação, com 1,4 mL do sobrenadante de extrato de proteínas nativas de folhas e ramos, em presença de Tampão Fosfato de Potássio 50 mM pH 6,0. Posteriormente à captura das proteínas presentes no extrato proteico, a resina foi lavada três vezes com o mesmo tampão. Os potenciais alvos que interagiram com MpNEP2 foram eluídos com 50 µl de glicina 50 mM pH 2,9, alternando com

volume igual de Tris-base 10mM para equilíbrio até um volume total de 200 µl. Entre cada etapa, a resina foi recuperada por centrifugação à 3000 rpm por 30s à 4 °C. As etapas da captura de proteínas alvo foram realizadas de acordo com Pirovani et al (2010).

2.6 Identificação por Espectrometria de Massa (MS/MS) e análises das proteínas capturadas

As proteínas alvo do extrato de *Theobroma cacao* capturadas por MpNEP2 recombinante foram adicionados a ureia 8M (1:1) e solução de DTT (ditiotreitól) 5 mM mantidas a 56 °C durante 25 min. Em seguida para alquilação, adicionaram-se 14 mM de iodoacetamida (IAA) às amostras que foram mantidas à temperatura ambiente, por 30 min, protegidas da luz. Para o *quench* ao IAA livre foi adicionado solução de DTT 5 mM incubando por 15 min à temperatura ambiente no escuro. As amostras foram posteriormente diluídas em 50 mM de NH₄HCO₃ (1:5), para reduzir a concentração de ureia, acrescentando solução 1 mM de CaCl₂. A solução contendo as proteínas foi submetida à digestão com tripsina (25 ng/µl) a 37 °C, por 16 h, de acordo com as recomendações do fabricante (Promega). A reação de digestão foi cessada com ácido fórmico 0,4%.

As digestões trípticas obtidas foram purificadas e concentradas utilizando Zip Tip[®] em pipeta de 10 µl contendo coluna de cromatografia em fase reversa C18, o procedimento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante (Millipore[®] ziptips). Após, o volume de cada amostra obtida foi concentrado à vácuo para 20 µl (Concentrador 5301, Eppendorf). Posteriormente, os peptídeos resultantes foram analisados por LC-MS/MS acoplado ao ESI-Q-TOF Micro (WATERS). Os espectros foram analisados usando o ProteinLynx Global Server 4.2 (WATERS) e as sequências geradas foram comparadas em bancos de dados genômicos CocoaGenDB de *T. cacao* (<http://cocoa-genome-hub.southgreen.fr/blast>).

Para a obtenção das sequências das proteínas em formato FASTA, foram utilizados números de acesso gerados pelas identificações dos programas ProteinLynx e CocoaGenDB no banco de dados do NCBI. Essas sequências foram analisadas pelo programa BLAST2GO (<https://www.blast2go.com/>) para a obtenção da caracterização funcional (quanto suas às funções, os processos biológicos e moleculares). Além disso, foi realizada a análise de rede de interação buscando homólogos em organismo modelo (*Arabidopsis thaliana*) utilizando o

servidor STRING versão 10.5 (<https://string-db.org/>) (JENSEN et al., 2009). Posteriormente, usando o padrão do STRING, as proteínas com maior *bitscore* (maior pontuação) foram selecionadas. Os dados gerados da rede foram transferidos para as ferramentas Cytoscape e plugin BiNGO, para uma melhor análise dos processos biológicos que as proteínas estão envolvidas.

2.7 Obtenção de estrutura 3D das proteínas identificadas

Para a obtenção *in silico* da estrutura 3D dos potenciais alvos de *T. cacao* que se acoplaram *in vitro* com MpNEP2 de *M. pernicioso*, foi necessária a construção de modelos 3D utilizando uma abordagem de modelagem por homologia.

As sequências das proteínas capturadas, foram submetidas ao BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (ALTSCHUL et al., 1997) restrito para o Banco de Dados de Proteína (PDB, <http://www.pdb.org/>) para busca de modelos. Utilizando o critério de identidade maior que 20 % (OSWALDO, 2003), os homólogos que demonstraram maior similaridade e cobertura (principalmente dos domínios) foram selecionadas como moldes. A modelagem em 3D foi realizada utilizando a ferramenta online SwissPDB Viewer v.3.7 (GUEx et al., 2009; BENKERT et al., 2011; BERTONI et al., BIENERT et al., 2017; WATERHOUSE et al., 2018), seguindo o protocolo padrão: 1) submissão da sequência (FASTA) das proteínas em estudo; 2) busca por modelos (*templates*); 3) seleção do melhor *template* para construção, seguindo os critérios citados acima; 4) envio de solicitação de modelagem para o servidor Swiss Model Server (SCHWEDE et al., 2003).

2.8 Validação das estruturas 3D obtidas

A avaliação da qualidade dos modelos obtidos foi realizada utilizando os programas PROCHECK 3.4 (LASKOWSKI et al., 1993), para a análise dos parâmetros estereoquímicos com diagrama de Ramachandran (RAMACHANDRAN et al., 1963), Verity 3D (BOWIE et al., 1991; LUETHY et al., 1992) para a verificação da compatibilidade do modelo atômico (3D) com sua própria sequência de aminoácidos (1D) e ProSA-web (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007) para análise do Z-score nas estruturas (níveis de energia).

2.9 Docking molecular

Para verificar em quais regiões a proteína MpNEP2 poderia interagir com proteínas do *T. cacao*, foi realizado o *docking* proteína-proteína utilizando os modelos 3D gerados contra a proteína de modelo cristalografado MpNEP2 (ZAPAROLI et al., 2011) utilizando o *software* ClusPro 2.0 Web Server (<http://cluspro.bu.edu/>) (KOZAKOV et al., 2017). Para filtragem dos resultados foram usados como parâmetros valores mais negativos de energia da interação (van der Waals, forças eletrostáticas e hidrofóbicas) e número de ocorrências em sítios aglomerados. Por meio de uma busca na literatura bem como, pela utilização do servidor Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (MITCHELL et al., 2019), foram identificados os resíduos de aminoácidos pertencentes ao sítio ativo e domínios conservados das proteínas. Imagens e mapas das interações foram gerados pelo programa BIOVIA Discovery Studio 2017R2.

3. RESULTADOS

3.1 Modificações pós-traducionais e caracterização estrutural, baseada na comparação das sequências de NLPs do genoma do fungo *M. pernicioso*

No presente estudo as cinco sequências de aminoácidos das proteínas NLPs presentes no genoma do fungo *M. pernicioso* foram alinhadas para analisar as similaridades entre a MpNEP2 e as demais sequências.

O resultado do alinhamento mostrou que as proteínas MpNEP1, 3, 4 e 5 compartilham com a MpNEP2 percentuais de 62, 56 %, 72, 99 %, 73 %, e 71,3 % de similaridade nas sequências de aminoácidos, respectivamente (Figura 1). As proteínas apresentam regiões altamente conservadas, além da região que caracteriza a família NLP destacada em vermelho (Figura 1). As modificações pós-traducionais preditas como ponto isoelétrico, peso molecular, possíveis sítios de O-glicosilação, fosforilação, acetilação e presença ou ausência de peptídeo sinal estão representados na Tabela 1.

A

B

Tabela 1. Análise de características estruturais das sequências dos resíduos de aminoácidos das proteínas NLPs de *M. pernicioso*. Predições obtidas pelos servidores fornecidos pelo ExPASy e MultiLoc2- HighRes, do ponto isoeletrico, peso molecular, da presença ou ausência de sítios de glicosilação, fosforilação, tamanho de peptídeo sinal e localização celular.

34

MpNEP3	8.59	25009.06	-	S ₅ , S ₁₈ , S ₆₆ , S ₉₇ , S ₁₂₅ , S ₁₅₈ , S ₁₉₁ , S ₂₁₂ , S ₂₂₀ , T ₂₀ , T ₅₅ , T ₆₅ , T ₇₀ , T ₇₄ , T ₇₅ , T ₁₁₆ , T ₁₄₃ , T ₁₄₄ , T ₁₇₂ , Y ₇₁ , Y ₁₃₃ e Y ₂₀₅	19 aa	Vacuolar 67%
MpNEP4	8.28	25009.06	-	S ₉ , S ₁₁ , S ₈₂ , S ₉₅ , S ₁₄₃ , S ₁₇₄ , S ₂₀₂ , S ₂₃₅ , S ₂₆₈ , S ₂₈₅ , T ₁₆ , T ₃₄ , T ₄₇ , T ₉₇ , T ₁₃₂ , T ₁₄₂ , T ₁₄₇ , T ₁₅₁ , T ₁₅₂ , T ₁₉₃ , T ₂₂₀ , T ₂₂₁ , T ₂₄₉ , Y ₁₈ , Y ₁₄₈ , Y ₂₁₀ e Y ₂₈₂	-	Vacuolar 63%
MpNEP5	6.49	25327.34	N ₁₃₄ , N ₁₅₉	S ₉ , S ₁₁ , S ₆₀ , S ₉₆ , S ₉₈ , S ₁₇₅ , S ₂₀₃ , T ₁₆ , T ₃₄ , T ₄₇ , T ₈₃ , T ₁₀₂ , T ₁₃₃ , T ₁₄₄ , T ₁₄₈ , T ₁₅₂ , T ₁₉₄ , T ₂₂₂ , T ₂₄₂ , T ₂₅₀ , T ₂₈₆ , Y ₁₈ , Y ₁₀₀ , Y ₁₀₄ , Y ₁₄₉ e Y ₂₁₁	-	Vacuolar 65%

- não possuem; aa: aminoácidos

As predições do ponto isoelétrico (pI) e massa molecular entre as sequências variaram de 5,79 à 8,51 e 24 à 26 kDa, respectivamente. Não foi verificado sítios de acetilação nas sequências analisadas e sítios de glicosilação em sequências de MpNEP2-4. Os peptídeos sinais presentes nas sequências MpNEP1-3 foram detectados com sítio de clivagem entre os aminoácidos 19-20, que não foram identificados para as sequências MpNEP4 e 5. Após a clivagem do peptídeo sinal as proteínas MpNEP1-3 assumem preditos pesos moleculares de ~24, 22.5, 23.9 kDa. MpNEP2 é a sequência com menos locais putativos de fosforilação comparado às demais sequências (Tabela 1).

A análise de localização utilizando o preditor MultiLoc-HighRes demonstrou que MpNEP1, 3, 4 e 5 são proteínas com maior probabilidade de localizar-se em vacúolos na célula, enquanto MpNEP2 apresenta localização extracelular (Tabela 1).

A identificação de resíduos desordenados foram analisados e comparados entre as sequências das proteínas estudadas. De acordo com as instruções de interpretação de saídas do PODR[®], previsões longas dentro de regiões preditas de “D” (desordem) possuem maior confiança que regiões curta de poucos aminoácidos ($\pm$ cinco), combinado os picos dessas regiões com score mais próximo a 1. Possíveis regiões intrinsecamente desordenadas, entre as

sequências comparadas, foram identificadas e estão graficamente representadas na Figura 2. As sequências possuíram 2 a 6 locais de possíveis desordens, com 13 a 23 resíduos de aminoácidos em regiões de longas extensões (Figura 3). Além disso, as proteínas comparadas possuem putativos resíduos desordenados em região de similaridade entre as sequências (Figura 3).

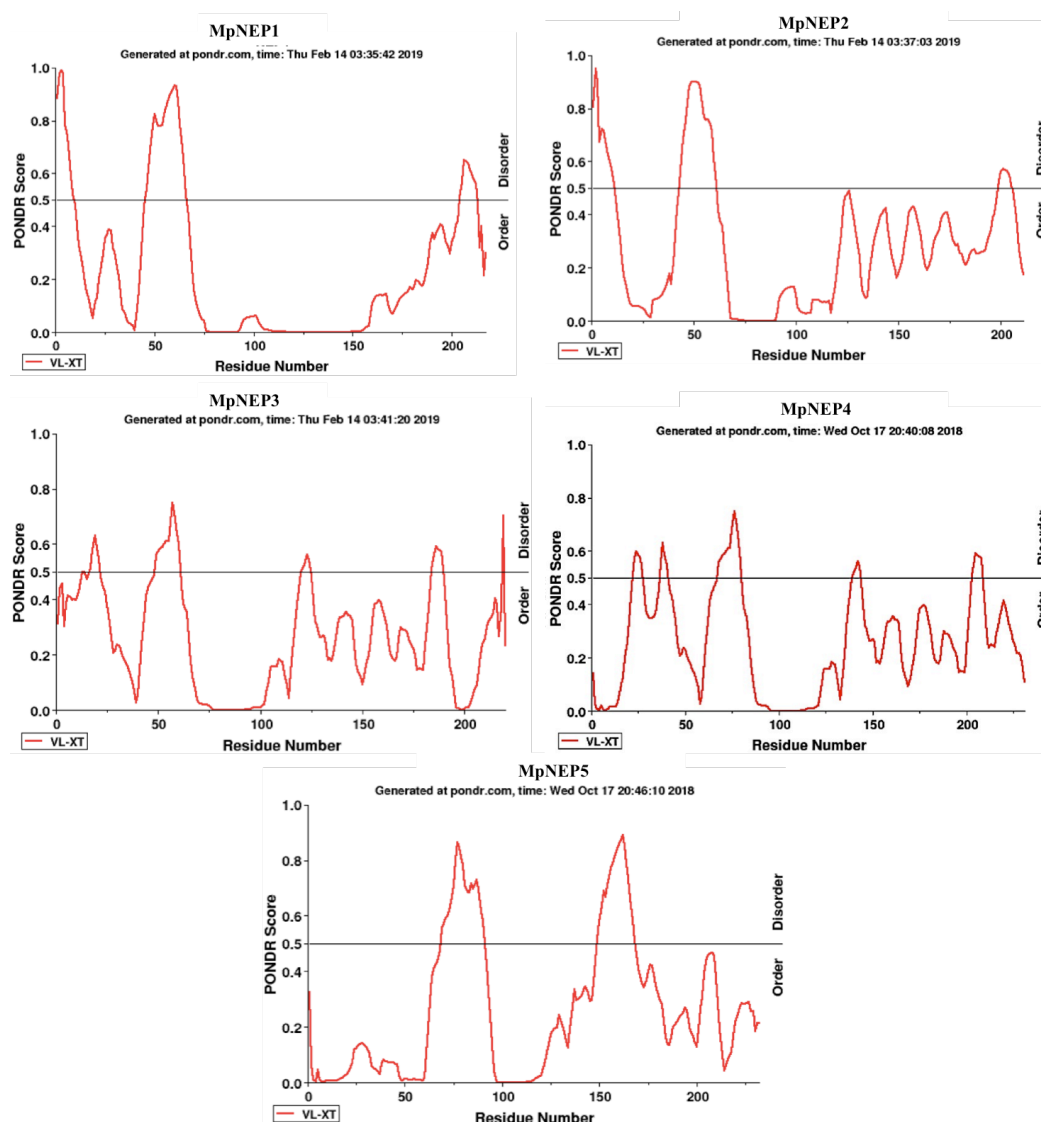


Figura 2. Predições de regiões desordenadas entre as sequências das proteínas MpNEP1-5, obtidas a partir do servidor POND[®]. Regiões de desordem entre as sequências de NLP de *M. perniciosus* indicada pelo gráfico com picos acima do *threshold*.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

nep1      MLYSSLLIVVLFIVTRSMSPHQLPHDQIAKFPKSGGPLETQYQPALHIGNGCHSYPAVD    60
nep2      MQLQN-FLSIVLLVVGAIAGTVMDDHDKIAKLPASGSPLETKFQPQLHIGNGCHSYPAVD    59
nep5      MQFSNLFIIIVLGAVSGALSATVKDHDKIDKLPASGSEYETTYQPKLHIGNGCHSYPAVD    60
nep3      MQFCNLFIIIVLGAVSGALSASVKNHDQIAKLPASGTNLENTYQPKLHIGNGCHSYPAVD    59
nep4      MQFCNLFIIIVLGAVSGALSASVKNHDQIAKLPASGTNLENTYQPKLHIGNGCHSYPAVD    59
          *   .  ::  ::  ..  .  :          **:* *:* **   *.  :**  *****:*****

nep1      VDGNWSSGGLYPSGSPSGGCRDITKGTQTYVRSTNDYHGKIAMVYAWYMPKDQVDPVLGIGH    120
nep2      AQGNWSSGGLKPTGAPSAACKDTSKAQTYVRSATFQKKTALVYAWYMPKDEIS--TGIGH    116
nep5      AEGNWSSGGLKPTGAPSAACKDRTKGTQTYVRTADDFKKGKIAMVYAWYMPKDVVT--SGFGH    118
nep3      AEGNWSSGGLKPTGAPSAACKDTSKAQTYVRTTDNYNGKIAMVYAWYMPKDVVT--SGFGH    117
nep4      AEGNWSSGLKPTGAPSAACKDTSKAQTYVRTTDNYNGKIAMVYAWYMPKDVVT--SGFGH    117
          .:***** *:***.**: *:*****:  :** *:***** :   *:*

nep1      RHDWEGAVVYLDKSTQAFAGVAFSAHGHWKYLEKDLNWFHFGTHVKAQYSAEPWINSH    180
nep2      RHDWEGAVVFLNSDTQQIDGVAASAHGKWRKYPNPGG--ANIDDTTHVKLQYSAEPVINSH    174
nep5      RHDWEGAVVFDRKTNRTGAVACSAHGGWRKYPNPGG--NNVNGTHARLQYSAEPVINSH    176
nep3      RHDWEGAVVFLDPKTKRIDGMACSAHGGWRKYPNPGG--NNVDTTHVKLQYSAEPLINSH    175
nep4      RHDWEGAVVFLDPKTKRIDGMACSAHGGWRKYPNPGG--NNVDTTHVKLQYSAEPLINSH    175
          *****::: .*:  *: * * * * * : .  :.: **: : ***** **:*

nep1      AVDLTDKDGDLPLDAQWARLGGAQQAINNIAHWGDTEPPISQRNYSLSLERSWMW----    236
nep2      ALDLTDKGGDLPTLASWEGMGADARAAINERSHWGDANPPIDSLIDSSLGAWMW----    230
nep5      ALDLTDKDGDLPTLAQWEQIGVPAQQAINDNSHWGKANPPIADHRMLNTLEGAWM----W    232
nep3      AIDLDKGGDLPTLARWEKIGPAAQKAINDGSHWGKSNPPIADKNYQKFLAGSLDVVRDW    235
nep4      AIDLDKGGDLPTLARWEKIGPAAQKAINDGSHWGKSNPPIADKNYQNSLQGAWMW----    231
          *:*****.*** ** *  :*  *:  ***:  :****:****:  *  :

nep1      ----      236
nep2      ----      230
nep5      ----      232
nep3      SCVR      239
nep4      ----      231

```

Figura 3. Destaque das regiões desordenadas no alinhamento entre as sequências de NEP1-5 de *M. pernicioso*. Resíduos desordenados indicados regiões representadas em cinza.

3.2 Viabilidade de MpNEP2 recombinante (rMpNEP2)

A proteína recombinante foi obtida e purificada por DIAS-VILLELA et al., 2013. A rMpNEP2 (com cauda de histidina) armazenada foi visualizada em SDS-PAGE e confirmada sua atividade biológica de necrose em folhas de *N. tabacum* (Figuras 4 e 5). Após 24 h foi observado na região inoculada com a proteína o aparecimento de necrose e em 72h os sintomas apresentaram-se mais definidos (Figura 5).

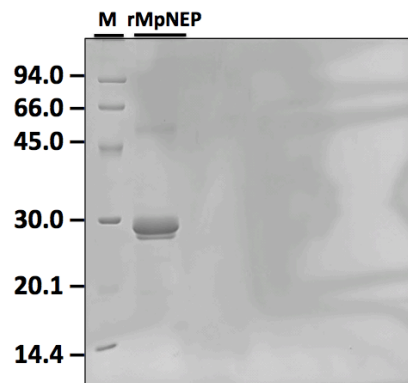


Figura 4. SDS-PAGE do perfil da proteína indutora de necrose e etileno (NEP). Fragmento NeP de 670 pb clonada em pET 28A, BamHI e HindIII, mantida em *E. coli*. BL21 *pUESC11. M: marcador de peso molecular em kDa.

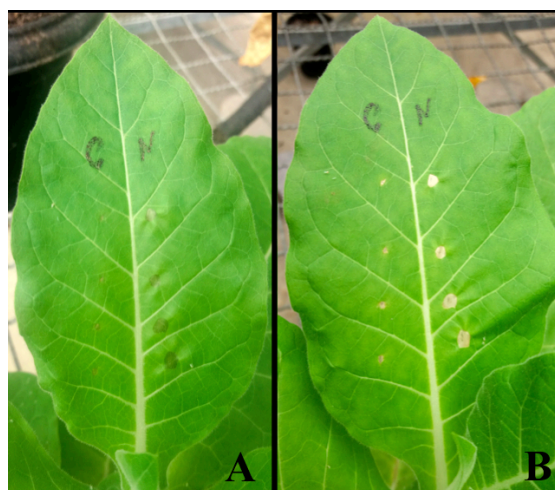


Figura 5. Teste de viabilidade da NEP purificada aplicada em folhas de *Nicotiana tabacum*. C: controle com água; N: Nep purificada. A – Após 24h de inoculação; B – Após 72h de inoculação.

3.3 Proteínas capturadas por MpNEP2 no extrato de *T. cacao* e principais características funcionais

O sistema de captura foi utilizado para verificar a interação entre MpNEP2 recombinante de *M. pernicioso* e proteínas de cacau. Seis diferentes proteínas foram capturadas a partir rMpNEP2 acoplada a CNBr-sepharose, em extrato de folhas e ramos de *T. cacao*, de dois genótipos contrastantes. As proteínas capturadas foram sequenciadas (MS/MS) e os peptídeos obtidos demonstraram 100% de possibilidade para proteínas metalo hidrolase oxiredutase (3 peptídeos), superfamília de ENTH ANTH VHS (2 peptídeos) e 11-beta-hidroxisteroide desidrogenase (12 peptídeos) de cacau CCN51. E 99.8%, 73.2% e 63.3% de possibilidades para fator de resposta a auxina (4 peptídeos), esfingosina quinase (5 peptídeos) e proteína tipo formina de cacau Catongo, respectivamente (Tabela 2). As identificações foram confirmadas em análises contra bancos de dados públicos do cacau (CocoaGenDB) e NCBI.

Tabela 2. Proteínas de *T. cacao* dos genótipos CCN51 e Catongo capturadas por MpNEP2 recombinante e identificadas em espectrometria de massas (MS/MS).

HOSPEDEIRO	NOME DA PROTEÍNA	ACESSO	mW(Da)	pI(pH)	PROBABILIDADE	NP
CCN51	Metalo hidrolase oxidoreductase	EOY27593.1	42673	7,6723	100	3
	Superfamília ENTH ANTH VHS	EOX98870.1	65033	4,8362	100	2
	11-beta-hidroxiesteroide desidrogenase	XP_017981129.1	114365	9,2234	100	12
CATONGO	Factor de resposta a auxina	XP_007027336.2	78083	6,3885	99,83	4
	Esfingosina quinase	XP_017978728.1	53664	6,3827	73,24	5
	Tipo Formina	XP_017979935.1	106075	5,5616	63,38	6

NP: número de peptídeos

Para conhecer a localização dessas proteínas, assim como a função molecular e os processos biológicos os quais estão envolvidas, para posteriormente estabelecer uma relação como alvos de interação de MpNEP2, as sequências das proteínas identificadas foram analisadas pelo Blast2Go e os resultados obtidos estão representados na Tabela 3.

Tabela 3. Análise de localização, função celular e processo biológico obtida pelo servidor BLAST2GO, das proteínas alvos capturadas por MpNEP2. Proteínas provenientes de folhas e ramos de *T. cacao*.

Proteínas alvos	Componente celular	Função molecular	Processo biológico
Metalo hidrolase oxidoreductase	*	Atividade hidrolase	*
Superfamília ENTH ANTH VHS	Vesícula revestida de clatrina	Ligação de clatrina, atividade redutase NAD (P) +	Conjunto de revestimento de clatrina e processo de oxido-redução
11-beta-hidroxiesteroide desidrogenase	Membrana celular	Atividade 11-beta-hidroxiesteroide desidrogenase (NADP +)	Processo de oxido-redução
Factor de resposta à auxina	Núcleo	Ligação ao DNA e atividade hidrolase	Regulação da transcrição e via de sinalização ativada por auxina
Esfingosina quinase	Membrana de vacúolo; complexo promotor de anáfase	Atividade de NAD + quinase; ligação de ATP; atividade de esfinganina quinase; D-eritro-esfingosina quinase; ligação do ácido fosfatídico	Processo metabólico dos esfingolipídios; germinação de sementes; regulação da metáfase mitótica / transição anafásica; processo catabólico dependente de complexo que

			promove a anáfase; fosforilação lipídica; resposta celular ao estímulo do ácido abscísico
Tipo formina	Parede celular, membrana celular e fragmoplasto	*	Desenvolvimento do endosperma, nucleação de actina e morfogênese de sementes

*Informações não fornecidas pelo BLAST2GO.

Para melhor compreender os possíveis processos biológicos pelos quais essas proteínas alvos estão envolvidas e suas associações, foi realizado a análise de ontologia gênica. As proteínas ortólogas correspondentes em organismo modelo *A. thaliana* foram selecionadas (indicadas na Tabela 4) e submetidas a uma rede de interações.

Tabela 4. Lista de proteínas ortólogas entre cacau e *A. thaliana* e suas similaridades.

Proteínas	Ortólogo	Anotação	Similaridade (%)	Bitscore
EOX98870.1	AT1G03050	ENTH/ANTH/VHS superfamily protein	65	744
EOY27593.1	AT1G30300	Metallo-beta-lactamase domain-containing protein	77	541
XP_017978728.1	SPHK1	Sphingosine kinase 1	63	993
XP_007027336.2	ARF16	Auxin response factor 16	60	771
XP_017979935.1	Fh5	Formin homology	52	795
XP_017981129.1	HSD5	Hydroxysteroid dehydrogenase 5	71	533

Por meio de dados de interações proteína-proteína conhecidas e previstas, incluindo suas associações diretas e indiretas, sob uma predição computacional, uma rede de interação foi gerada formando grupos (clusters).

A partir da análise da rede de interações foi possível visualizar os principais processos biológicos em que as proteínas estão envolvidas. A rede obtida apresentou 289 nós, 2138 conectores com a formação de 7 clusters. Utilizando a análise BiNGO os processos biológicos mais representativos na rede foram àqueles baseados no filamento de actina, relacionado a organização dos componentes celulares (cluster 1); dobramento de proteínas, processo metabólico primário e processo metabólico de proteína celular (clusters 2 e 7); processo metabólico do DNA, resposta celular ao estresse (cluster 3); transporte e localização de proteínas (cluster 4); processo catabólico de proteínas (cluster 5); resposta ao estímulo endógeno, como auxina e à estímulos de substâncias orgânicas (cluster 6). Apenas duas interações foram observadas entre os clusters (2-7; 3-5) (Figura 6).

As proteínas em estudo demonstraram possíveis associações com proteínas de conectividades representativas nos clusters. Fh5 no cluster 1, interagiu diretamente com proteína com papel significativo no fluxo citoplasmático, a ACT12 (Actina-12). Possui também interação indireta com Fator de alongação da tradução o EF1A (AT1G18070). A HSD5 no cluster 2, associou-se diretamente com proteínas: ACC1 (Acetil-CoA carboxilase) enzima que catalisa a carboxilação de acetil – CoA (AT1G71180); 3-hidroxi-isobutirato desidrogenase, proteína oxido-redutase e atividade catalítica; Proteínas multifuncionais (AIM1 e MFP2); Glicinas desidrogenases (GLDP2 e GLDP1). Sendo que este último cluster conectou-se ao cluster 7 no qual a SPHK1 relacionou-se de forma direta às proteínas da família TCP-1 (Chaperoninas) (Figura 6).

No cluster 3 a AT1G30300 demonstrou associação direta com AT1G10520 (DNA polimerase lambda), proteína de reparo, que conectou os clusters 3 e 5. A AT1G03050 no cluster 4 interagiu diretamente com AT5G11710, AT3G559290, AT2G43160, proteínas de tráfico vacuolar. Relacionando-se também a AT3G1130, intermediária da endocitose e necessária para uma distribuição padrão dos transportadores de auxina PIN. A AFR16 no cluster 6 interagiu diretamente às proteínas de auxina (IAA33, IAA32, IAA26, IAA5) (Figura 6).

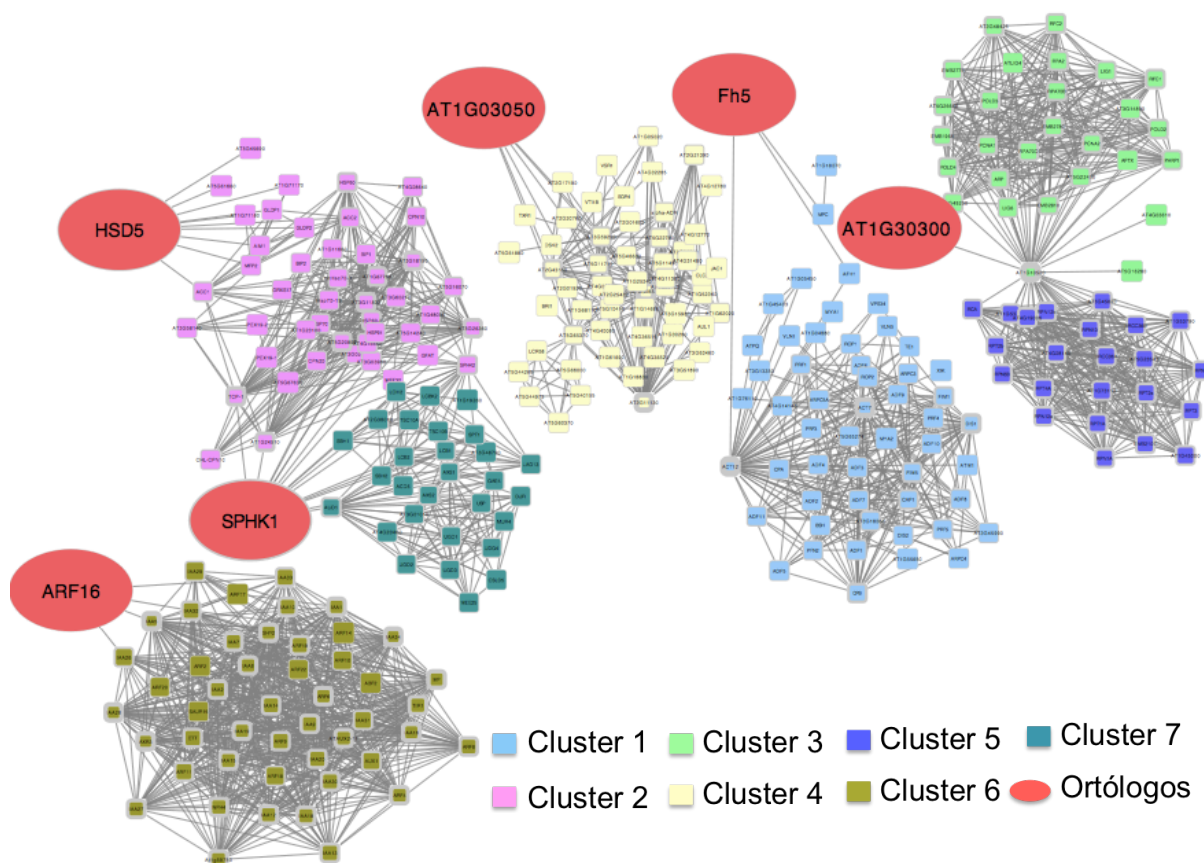


Figura 6. Rede de interações com proteínas de *A. thaliana* ortólogas as proteínas alvos capturadas em extrato de *T. cacao*. Rede de interações gerada pelo STRING, Cytoscape e plugin BiNGO, com clusters em diferentes cores representando grupos de proteínas envolvidas em diferentes processos biológicos, as proteínas ortólogas correspondentes a proteínas de cacau e a interação com os clusters. Cluster 1 (Fh5) corresponde à proteínas de organização do componente celular; cluster 2 (HSD5) para processo metabólico de proteínas celular; cluster 3 (AT1G30300) para processos metabólicos de DNA; cluster 4 (AT1G03050) localização e transporte de proteínas; cluster 5 (AT1G30300) processos catabólico de proteínas; cluster 6 (ARF16) processos de resposta ao estímulo de hormônios; cluster 7 (SPHK1) processos metabólicos primário e de açúcar.

3.4 Modelos e validações de estruturas 3D das proteínas identificadas

Os modelos das proteínas identificadas foram adquiridos pelo SWISS MODEL (WATERHOUSE et al., 2018). A partir de buscas em banco de dados disponível Protein Data Bank (PDB) de proteínas previamente descritas, foram selecionadas aquelas que apresentaram melhor cobertura e identidade para a construção de modelos de cada proteína capturada. A seleção foi realizada para as proteínas que apresentavam identidade acima de 20%. A única proteína que apresentou identidade abaixo foi Tipo formina, no entanto foi verificada a conservação de domínios importantes na obtenção do modelo.

O modelo de Fator de Resposta a Auxina (ARF) obtido apresentou 380 aminoácidos com 7 α -hélices, 17 folhas- β e 14 alças (Figura 7a). O gráfico de Ramachandran obtido pelo PROCHECK para este modelo (Figura 7c) revelou que 96% dos resíduos estão em regiões

muito favoráveis e favoráveis. Com dados obtidos pelo ProSA verificou-se as regiões de melhor alinhamento (azul até vermelho) e regiões que possuíram alguns prováveis erros (em vermelho) (Figura 7b). O Z-score da predição do modelo exibiu valor -5.75, o que representa boa qualidade da estrutura 3D, estando a mesma dentro da faixa de escores caracteristicamente apresentados pelas proteínas nativas de tamanho similar (Figura 7d).

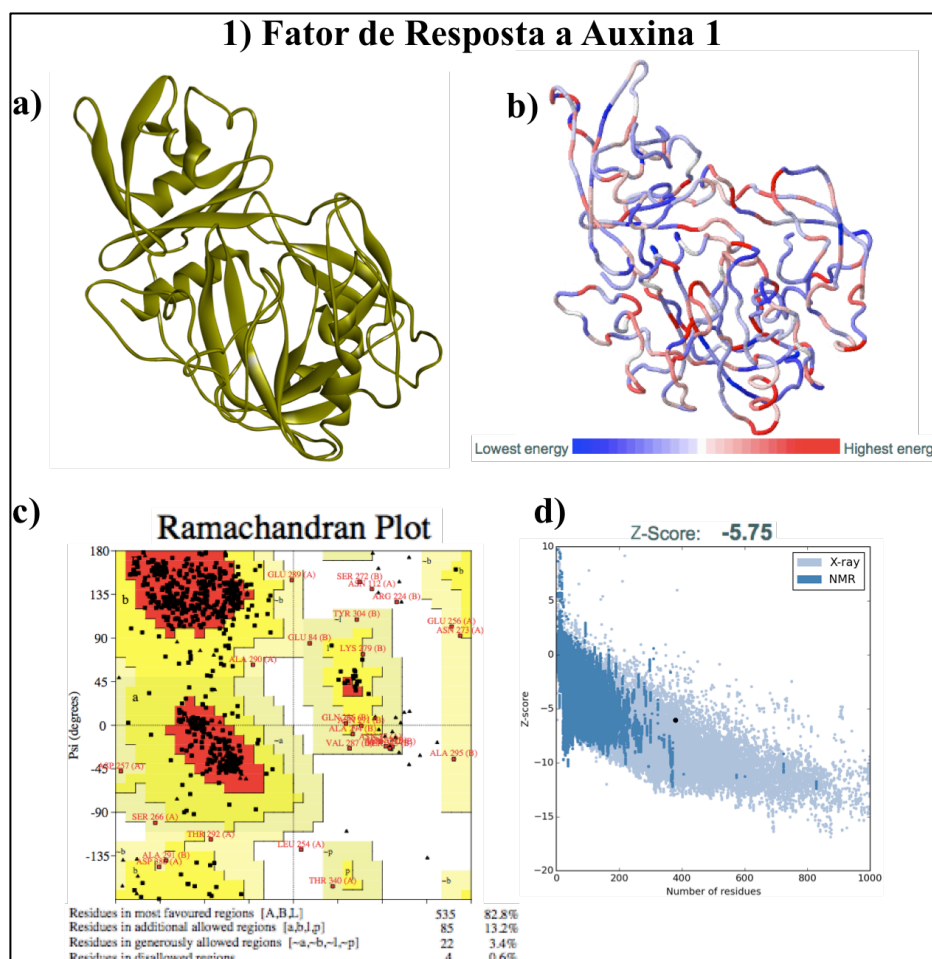


Figura 7. Modelo 3D do Fator de Resposta a Auxina (AFR). **a)** estrutura 3D predita em formato cartoon da proteína AFR. **b)** modelo exibindo regiões de alta (vermelho) e baixa energia (azul até vermelho) do modelo. **c)** gráfico Ramachandran com a qualidade estereoquímica da molécula. **d)** o escore Z representando a qualidade geral do modelo.

A estrutura 3D predita de 11-beta hidroxiesteroide desidrogenase contém 258 resíduos de aminoácidos (cadeia A), com 31 α -hélices, 14 folhas- β e 23 alças (Figura 8a). O ProSA por meio da análise de estrutura evidenciou 8 regiões de alta energia (em vermelho), no entanto a maior parte do modelo apresentou bons níveis de energia (Figura 8b). O escore z avaliado foi de -5.8, demonstrando similaridade no alinhamento com estruturas determinadas

experimentalmente no PDB (Figura 8d). Na análise estereoquímica da molécula foi constatado que 86,4% dos resíduos estão situados em regiões muito favoráveis, 10,6% em regiões favoráveis, 1,9% em regiões pouco favoráveis e 1,1% em regiões desfavoráveis (Figura 8c).

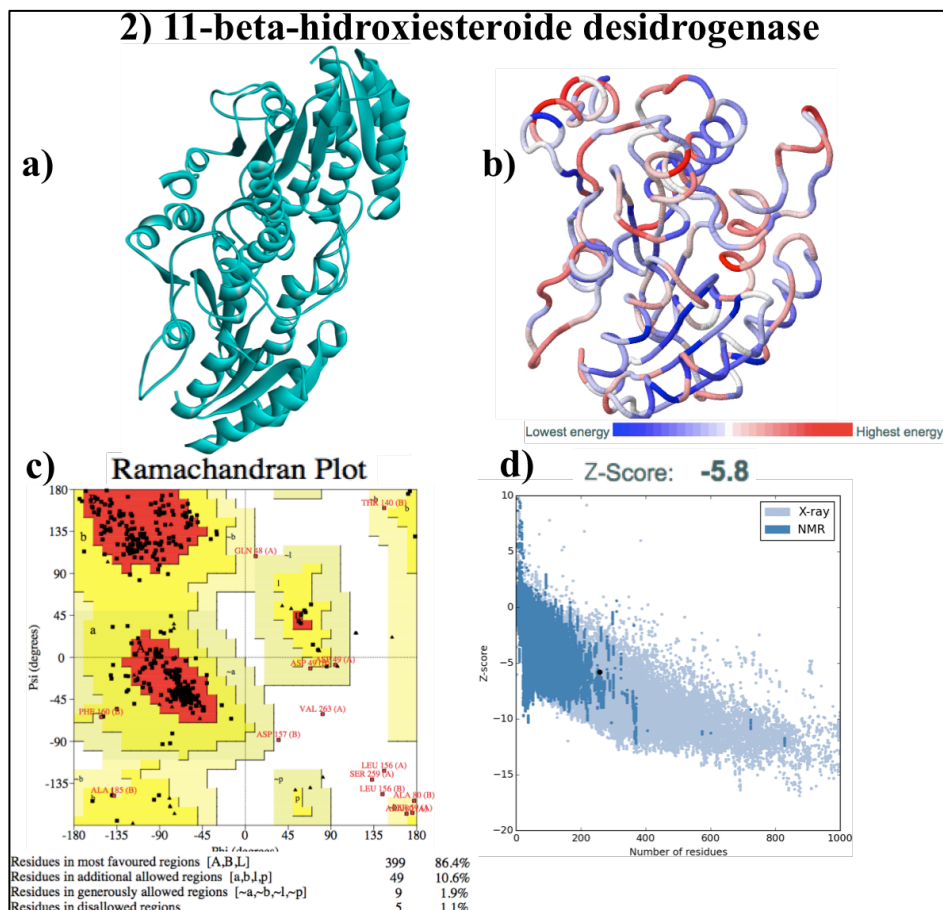


Figura 8. Modelo 3D da 11-beta hidroxiesteroide desidrogenase. a) estrutura 3D predita em formato cartoon da proteína 11-beta hidroxiesteroide desidrogenase. **b)** modelo exibindo regiões de alta (vermelho) e baixa energia (azul até vermelho) do modelo. **c)** gráfico Ramachandran com a qualidade estereoquímica da molécula. **d)** o escore Z representando a qualidade geral do modelo.

O modelo 3D da superfamília de proteínas com domínios ENTH ANTH VHS é constituído por 256 aminoácidos, apresentando 14 α -hélices, 2 folhas- β e 15 alças (Figura 9a). Possuindo estrutura com 98,8 % dos resíduos em regiões permitidas, apenas 3 aminoácidos apresentaram-se localizados em regiões pouco favorável e desfavorável, demonstrado no gráfico de Ramchandran, constituindo uma boa estereoquímica (Figura 9c). Z-score (Figura 9d) exibiu o valor -6.84 com estrutura alinhada com proteínas de estruturas já descritas.

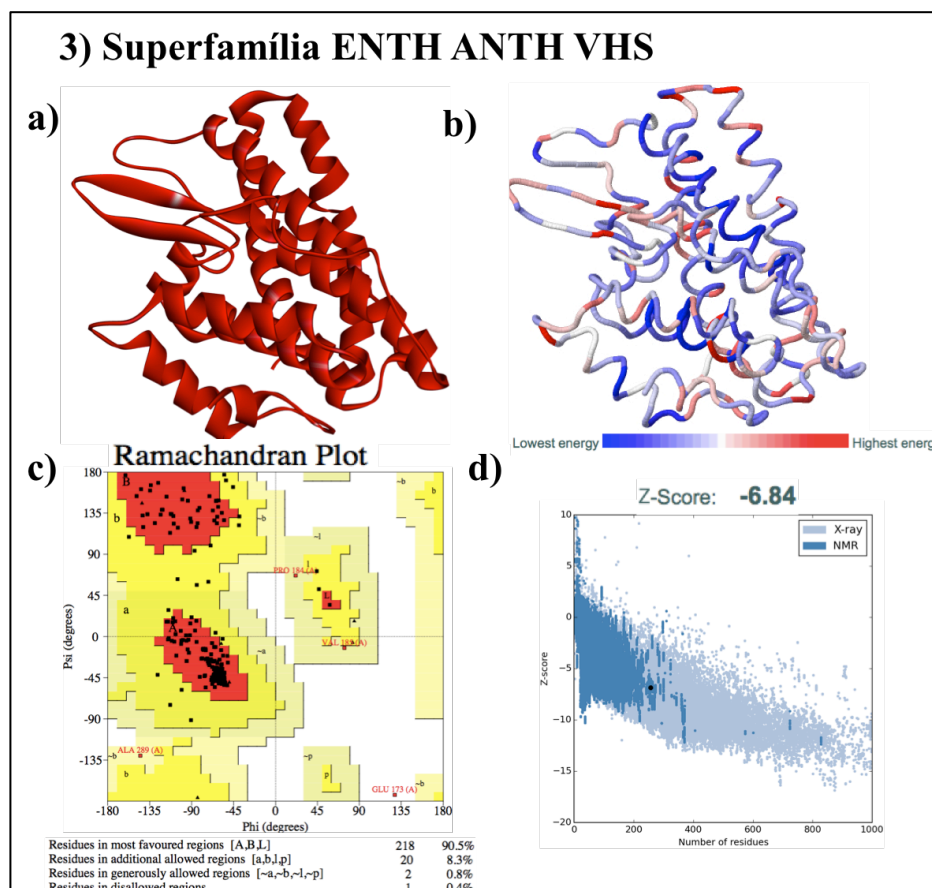


Figura 9. Modelo 3D da superfamília ENTH ANTH VHS a) estrutura 3D predita em formato cartoon da proteína. b) modelo exibindo regiões de alta (vermelho) e baixa energia (azul até vermelho) do modelo. c) gráfico Ramachandran com a qualidade estereoquímica da molécula. d) o escore Z representando a qualidade geral do modelo.

Os resíduos de aminoácidos da construção obtida de Esfingosina quinase estão 98,3% localizados em regiões muito favoráveis e favoráveis e apenas 5 resíduos estão em regiões fora do permitido, de acordo com o gráfico de Ramachandran (Figura 10c). A estrutura possui 361 aminoácidos, com 15 folhas- β , 15 α -hélices e 20 alças (Figura 10a). O resultado gerado a partir do ProSA demonstrou algumas regiões de alta energia (Figura 10b), no entanto o modelo apresentou o Z-score dentro da faixa de escores de proteínas determinadas experimentalmente, exibindo uma boa qualidade (Figura 10d).

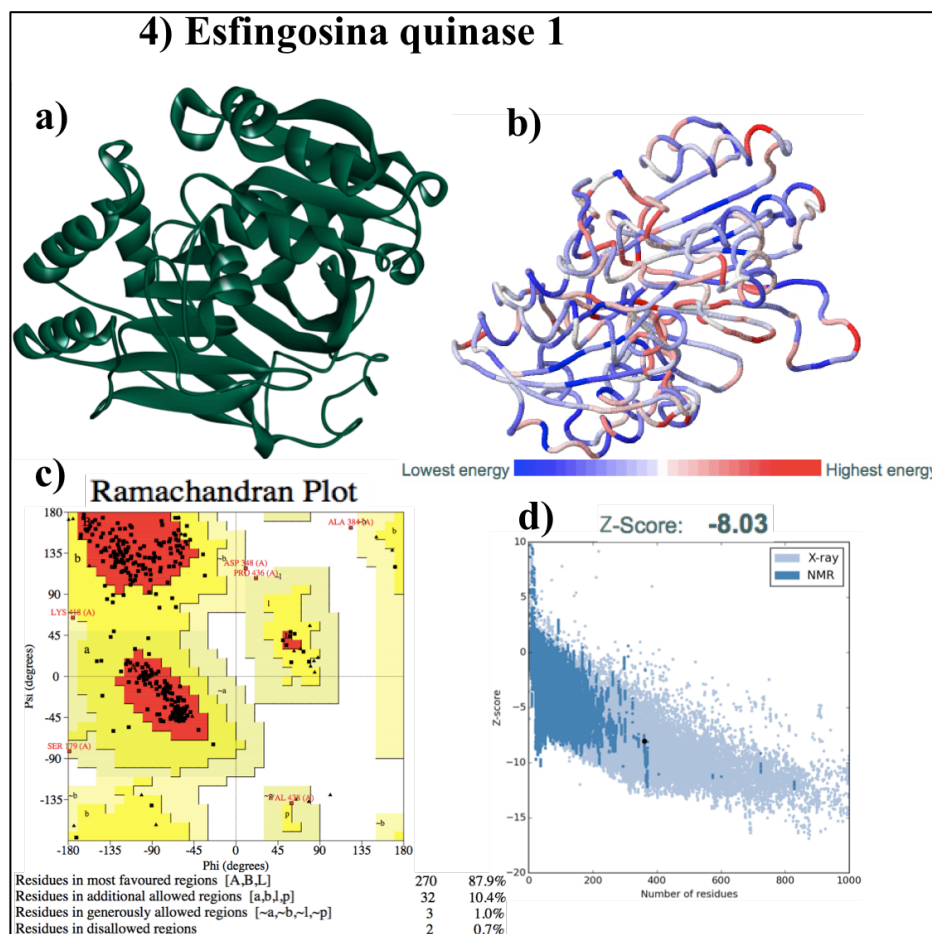


Figura 10. Modelo 3D da superfamília Esfingosina quinase 1 **a)** estrutura 3D predita em formato cartoon da proteína. **b)** modelo exibindo regiões de alta (vermelho) e baixa energia (azul até vermelho) do modelo. **c)** gráfico Ramachandran com a qualidade estereoquímica da molécula. **d)** o escore Z representando a qualidade geral do modelo.

A predição da estrutura 3D da proteína Tipo formina apresentou 27 α -hélices e 25 alças, podendo ser classificada como uma proteína de classe α (Figura 11a). O modelo contém 418 resíduos de aminoácidos, sendo que 96,9 % estão em regiões permitidas segundo o gráfico de Ramachandran (Figura 11c). Os dados obtidos do ProSA apresentou o Z-score -6,28 demonstrando similaridade com estruturas de proteínas previamente descritas (Figura 11d), porém a presença de regiões de alta energia (em vermelho) na estrutura sinalizando o choque de aminoácidos em algumas regiões do modelo (Figura 11b).

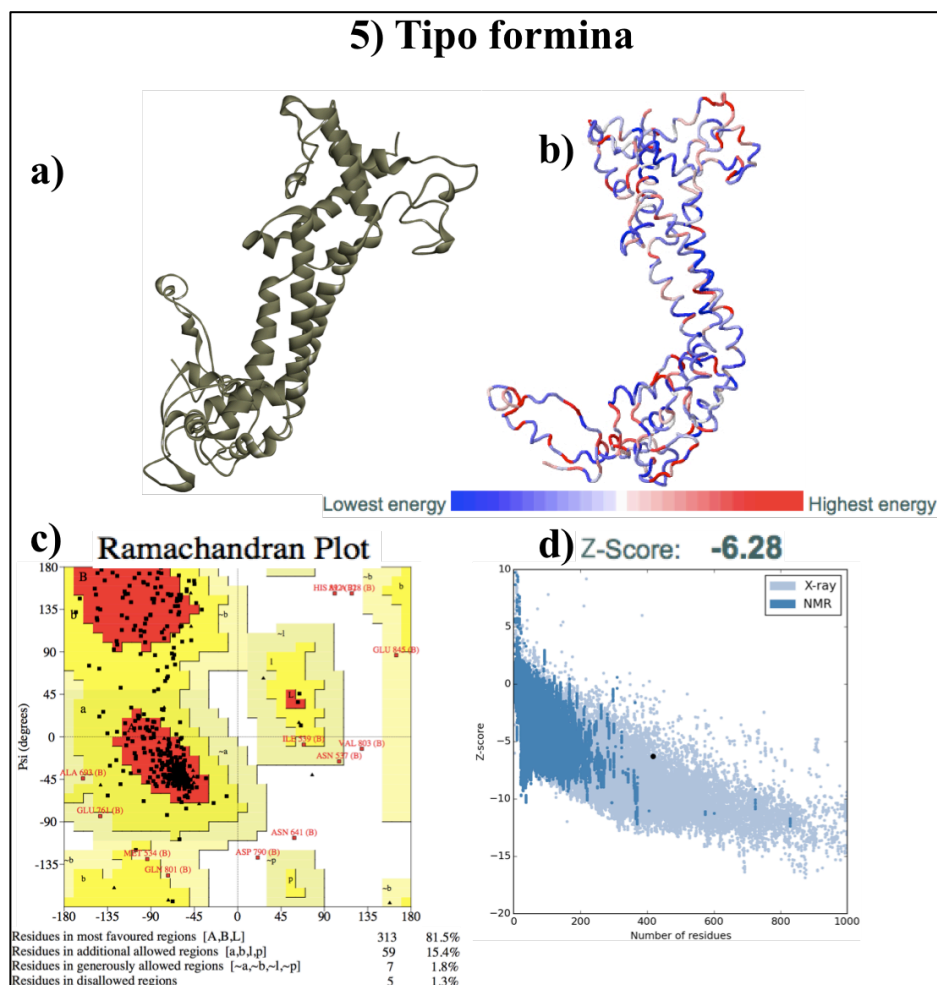


Figura 11. Modelo 3D da proteína Tipo formina. **a)** estrutura 3D predita em formato cartoon da proteína. **b)** modelo exibindo regiões de alta (vermelho) e baixa energia (azul até vermelho) do modelo. **c)** gráfico Ramachandran com a qualidade estereoquímica da molécula. **d)** o escore Z representando a qualidade geral do modelo.

O modelo Metallo hidrolase oxidoretudase possui 301 aminoácidos, com 13 folhas- β , 10 α -hélices e 18 alças (Figura 12a). 95,7% dos resíduos estão localizados em regiões muito favoráveis e favoráveis, representados no gráfico de Ramachandran (Figura 12c). A avaliação do ProSA demonstrou na estrutura predita poucas regiões de alta energia (Figura 12b), representadas na cor vermelha, entretanto o seu Z-score (Figura 12d) apresenta equivalência com as demais estruturas comparadas já determinadas pelo PDB.

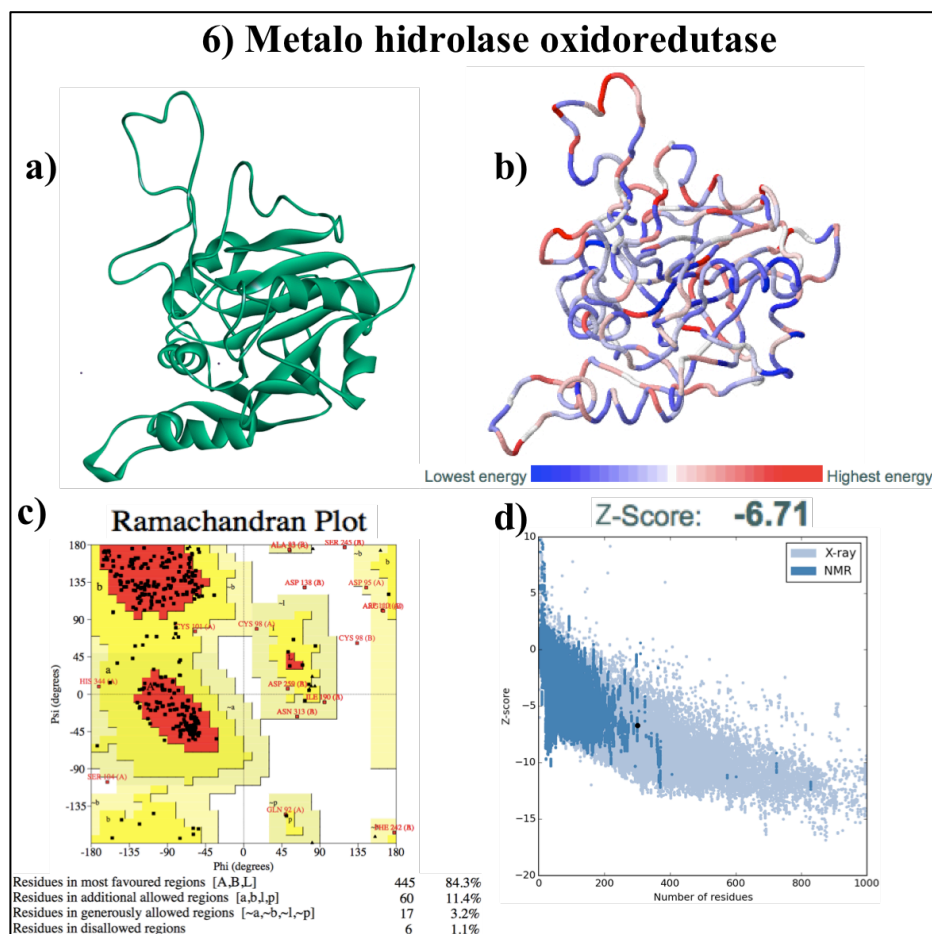


Figura 12. Modelo 3D da Metallo hidrolase oxidoreductase. a) estrutura 3D predita em formato cartoon da proteína. **b)** modelo exibindo regiões de alta (vermelho) e baixa energia (azul até vermelho) do modelo. **c)** gráfico Ramachandran com a qualidade estereoquímica da molécula. **d)** o escore Z representando a qualidade geral do modelo.

Outras validações, para os modelos construídos, foram realizadas para garantir a qualidade das estruturas 3D (mostrado no material suplementar 1). As construções obtidas apresentaram boa estrutura de acordo com os parâmetros analisados. Apenas o modelo predito do Tipo Formina deve ser revisto, realizando modelagem também pelo programa Modeller, a fim de adquirir uma estrutura com menos regiões de alta energia e melhor identidade ao molde. As proteínas foram submetidas ao *docking* com MpNEP2 de estrutura descrita por Zaparoli e colaboradores (2011).

3.5 Interações dos modelos com MpNEP2–Docking

Utilizando a ferramenta ClusPro foram verificadas as possíveis interações das proteínas resultantes da captura por MpNEP2 *in vitro*. Para todos os modelos construídos, o

docking ocorreu em aminoácidos Val170; Pro169 (Figura 13c), His116 (Figura 14c; 15b; 16b; 17c; 18c) na MpNEP2.

A formação dos complexos proteicos ocorreu em várias conformações possíveis, das quais apenas uma, para cada modelo (a mais favorável e de acordo com critérios citados nos material e métodos), foi selecionada.

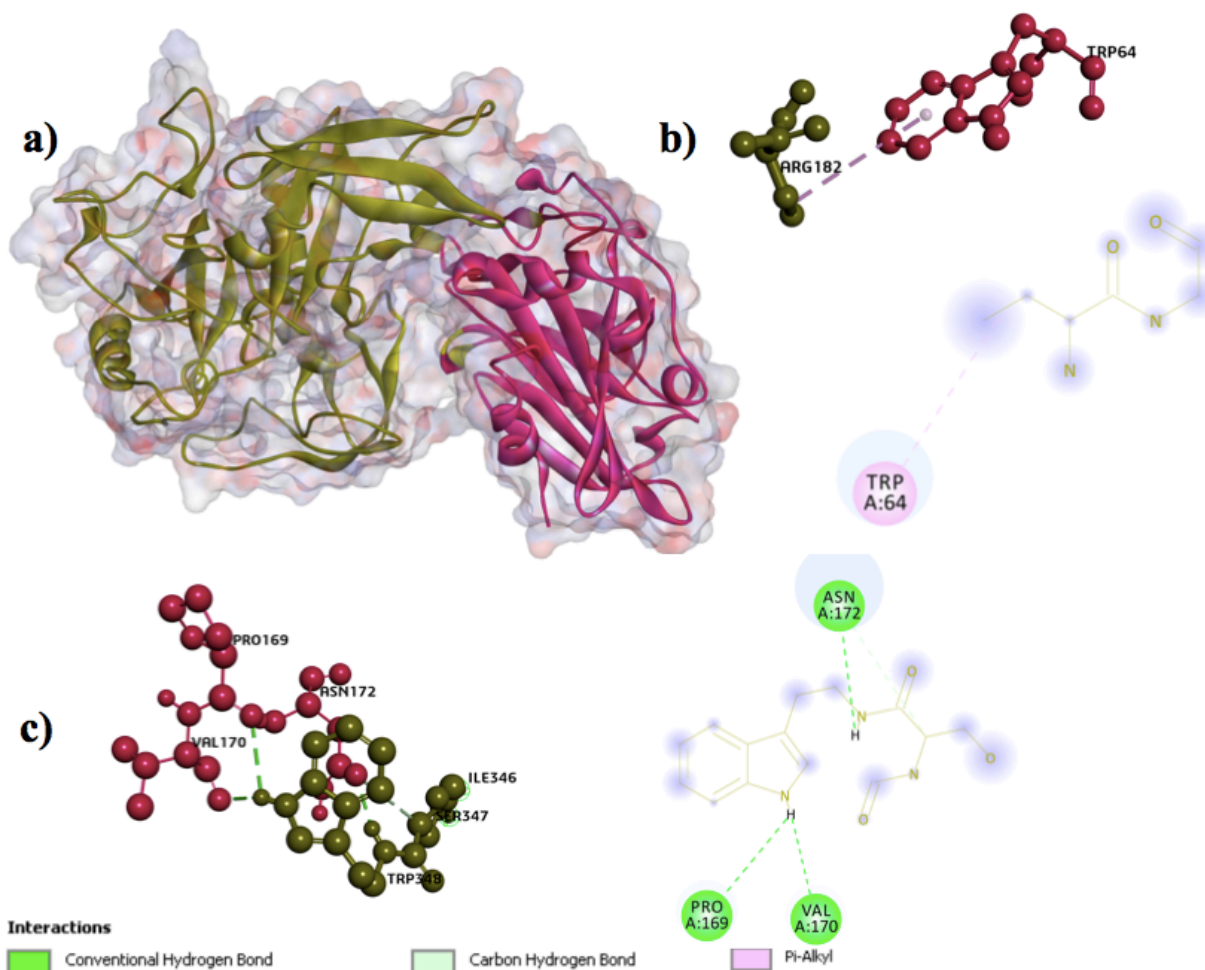


Figura 13. Docking entre Fator de Reposta a Auxina (ARF) e MpNEP2. **a)** superfície molecular com a estrutura do complexo: ligante ARF (verde) – receptor MpNEP2 (rosa), destacando em amarelo a região de interação. **b)** representações da interação Arg182-Trp64. **c)** representações das interações Val170-Trp348-Pro169; Asn172-Ser347.

O complexo Fator de Reposta a Auxina (ligante)-MpNEP2 (receptor) apresentou energia de afinidade -715,8 E/kT (Figura 13a), com interação de Pi-Alkyl entre os aminoácidos Arg182-Trp64 (Figura 13b). Além disso, encaixes de ligações de hidrogênio entre Val170-Trp348 e Pro169-Trp348 ocorreram para esse complexo.

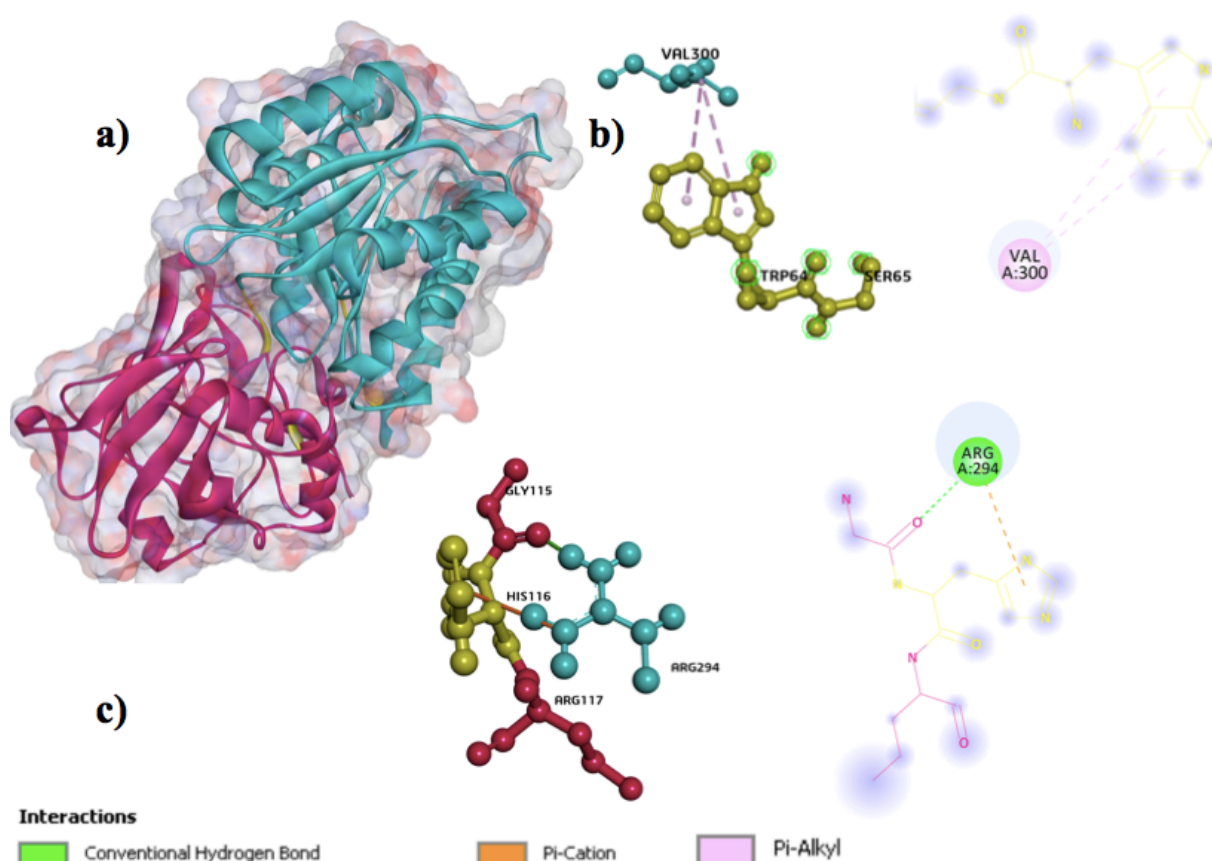


Figura 14. Docking entre 11-beta hidroxisteroide desidrogenase e MpNEP2. a) superfície molecular com a estrutura do complexo: receptor 11-beta hidroxisteroide desidrogenase (azul) – ligante MpNEP2 (rosa), destacando em amarelo a região de interação. b) representações da interação Val300-Trp64. c) representações das interações Arg294-His116.

A estrutura 11-beta hidroxisteroide desidrogenase (receptor)-MpNEP2 (ligante) exibiu energia de -809,7 E/kT (Figura 14a), realizando interações de ligação de hidrogênio e Pi-Cation entre os aminoácidos Arg294-Gly115 e Arg294-His116, respectivamente (Figura 14c). Ainda, ligações Pi-Alkyl ocorreram entre Val300-Trp64 para essa estrutura (Figura 14b).

O resultado do docking para o complexo superfamília ENTH ANTH VHS (receptor)-MpNEP2 (ligante) (Figura 15a) ocorreu entre o domínio ANTH do receptor em aminoácidos Thr241, Glu242, Asn174 (de ligação a clatrina) e em regiões do ligante com possível atividade necrotrófica e intrinsecamente desordenada (predita pelo presente estudo, figuras 2 e 3), em resíduos de His116 e Lys69. Ocorrendo interações de hidrogênio e Pi-sigma entre Thr241-His116 (Figura 15b), e ligações de hidrogênio e sal entre os aminoácidos Asn174-Lys69; Glu242-Lys69 (Figura 15c), cuja energia de afinidade foi de -669,8 E/kT.

Esfingosina quinase (receptor)-MpNEP2 (ligante) revelou interação de hidrogênio, Pi-

cation e Pi-alkyl entre os aminoácidos Lys401-His116 (Figura 16a,b), com energia -594.7 E/kT.

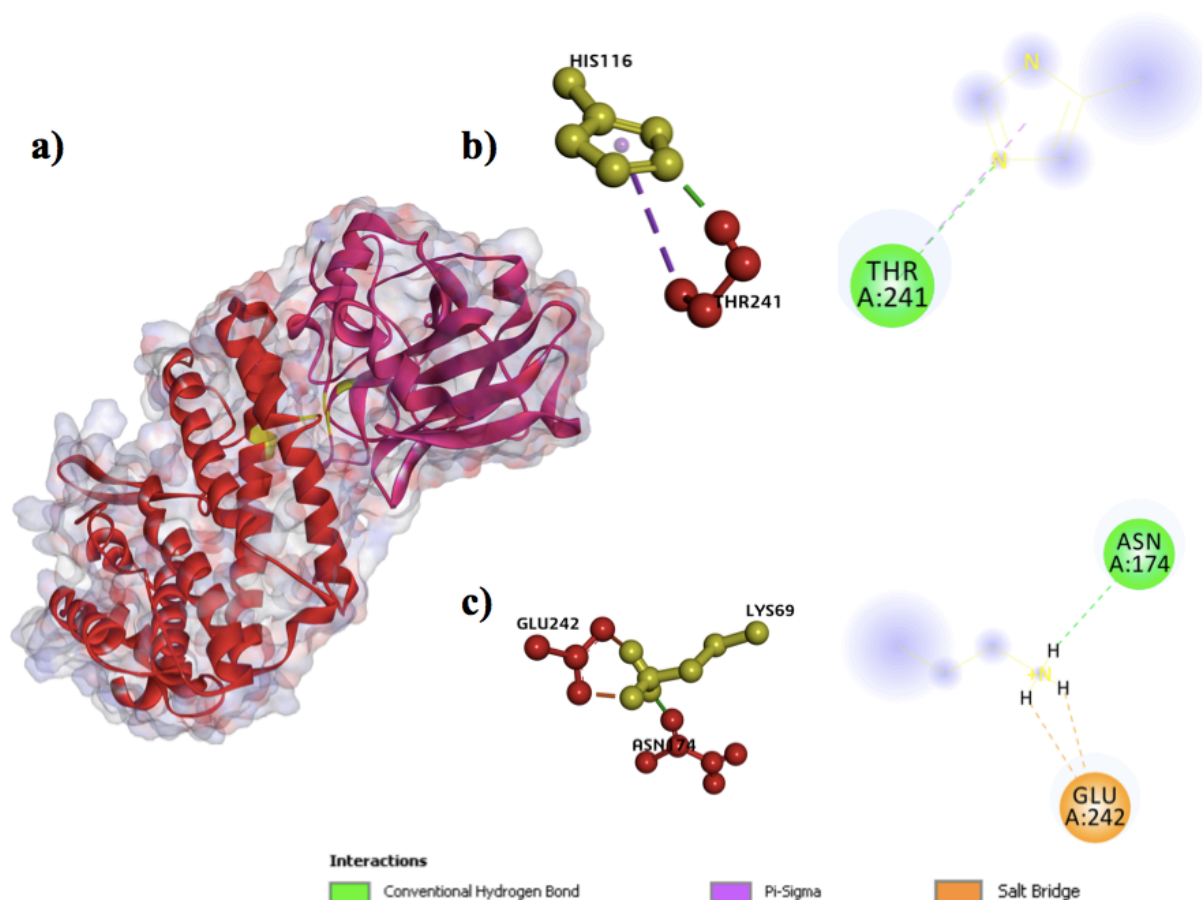


Figura 15. Docking entre superfamília ENTH ANTH VHS (EAV) e MpNEP2. a) superfície molecular com a estrutura do complexo: receptor EAV (vermelho) – ligante MpNEP2 (rosa), destacando em amarelo a região de interação. b) representações da interação Thr241-His116. c) representações das interações Glu242-Lys69-Asn174.

O complexo Tipo formina (ligante)–MpNEP2 (receptor) (Figura 17a) demonstrou energia de afinidade -884,3 E/kT, com interações no domínio FH2 de ligação a actina, nos aminoácidos Phe521; Phe522; Met534; Val535; Trp536 da formina e nos resíduos His116; Asp210 de MpNEP2. Ligações de hidrogênio ocorreram entre Phe521-Gly20; Phe522-Val22 (Figura 17b); Val535-Asp210; Trp536-Asp210 e ligações Pi-alkyl em Met534-His116; Val535-His116 (Figura 17c).

Docking entre Metalo hidrolase oxiduredutase (ligante)-MpNEP2 (receptor) (Figura 18a) revelou ligações de hidrogênio nos aminoácidos Met88-Lys69 (Figura 18b), ligações de hidrogênio e Pi-alkyl entre Lys141-His116 (Figura 18c). A energia de afinidade da interação foi -825,1 E/kT. O resíduo Lys141 do ligante, está localizado em uma região de domínio LactamaseB2 descrito pelo *Interpro*. Além disso, as interações no receptor ocorreram em

regiões de possível atividade para a proteína, nos resíduos de aminoácidos de His116 e Lys69, sugerido por este estudo como um aminoácido da alça predita como desordenada.

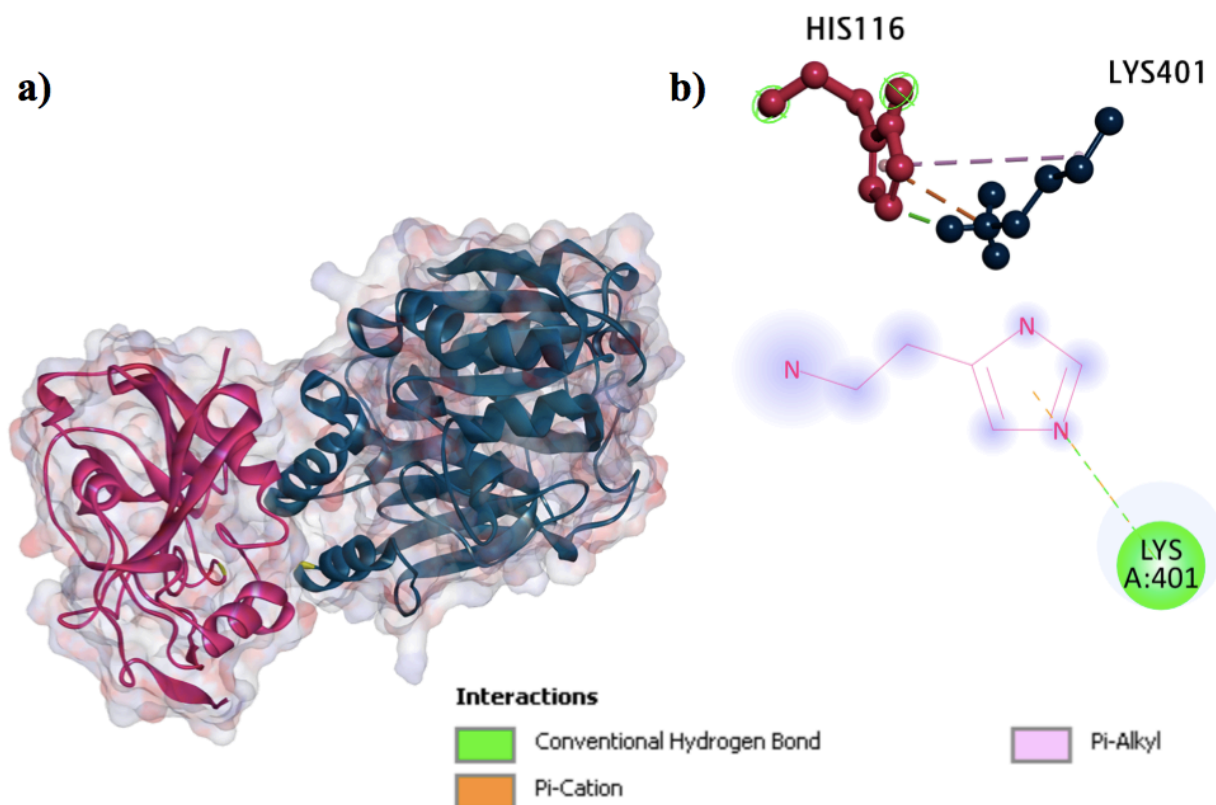


Figura 16. Docking entre Esfingosina quinase e MpNEP2. a) superfície molecular com a estrutura do complexo: receptor Esfingosina quinase (azul escuro) – ligante MpNEP2 (rosa), destacando em amarelo a região de interação. b) representações da interação Lys401-His116.

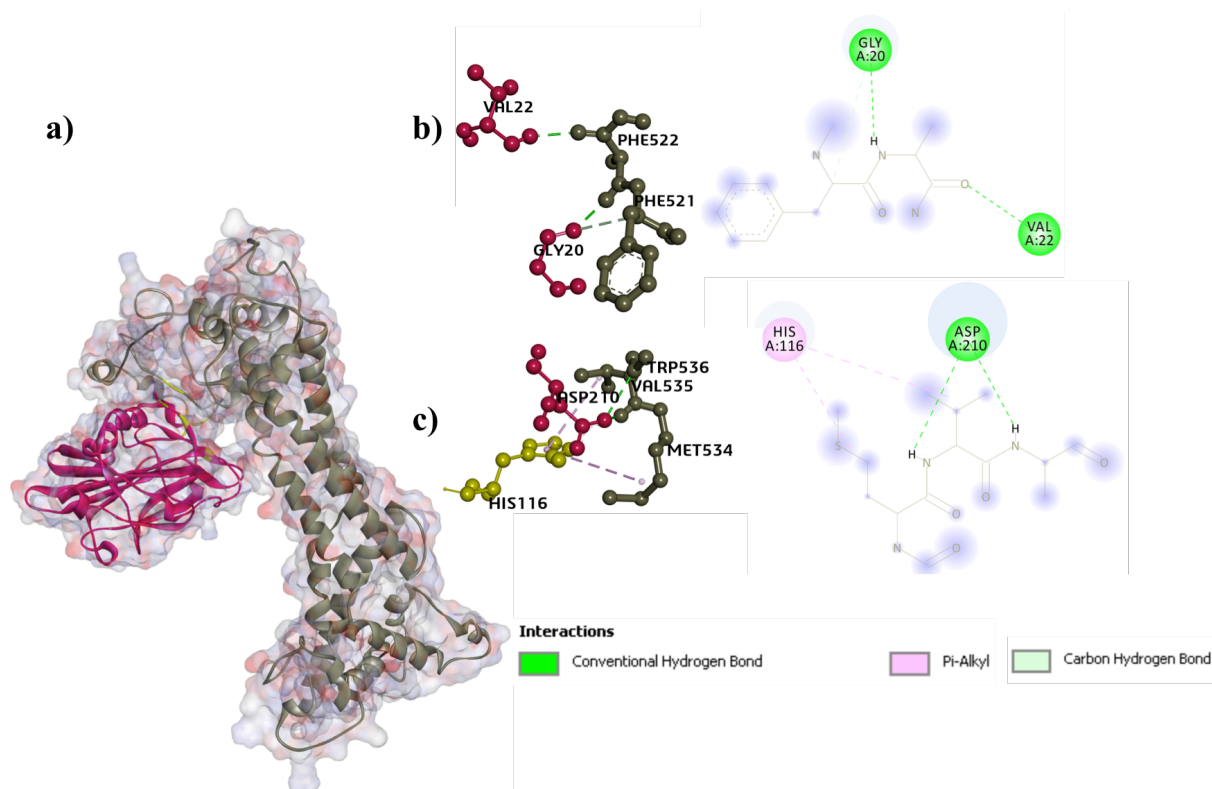


Figura 17. Docking entre Tipo formina e MpNEP2. **a)** superfície molecular com a estrutura do complexo: ligante Tipo formina (cinza) – receptor MpNEP2 (rosa), destacando em amarelo a região de interação. **b)** representações da interação Phe521-Gly20; Phe522-Val22. **c)** representações das interações Met534-His116; Val535-His116; Val535-Asp210; Trp536-Asp210.

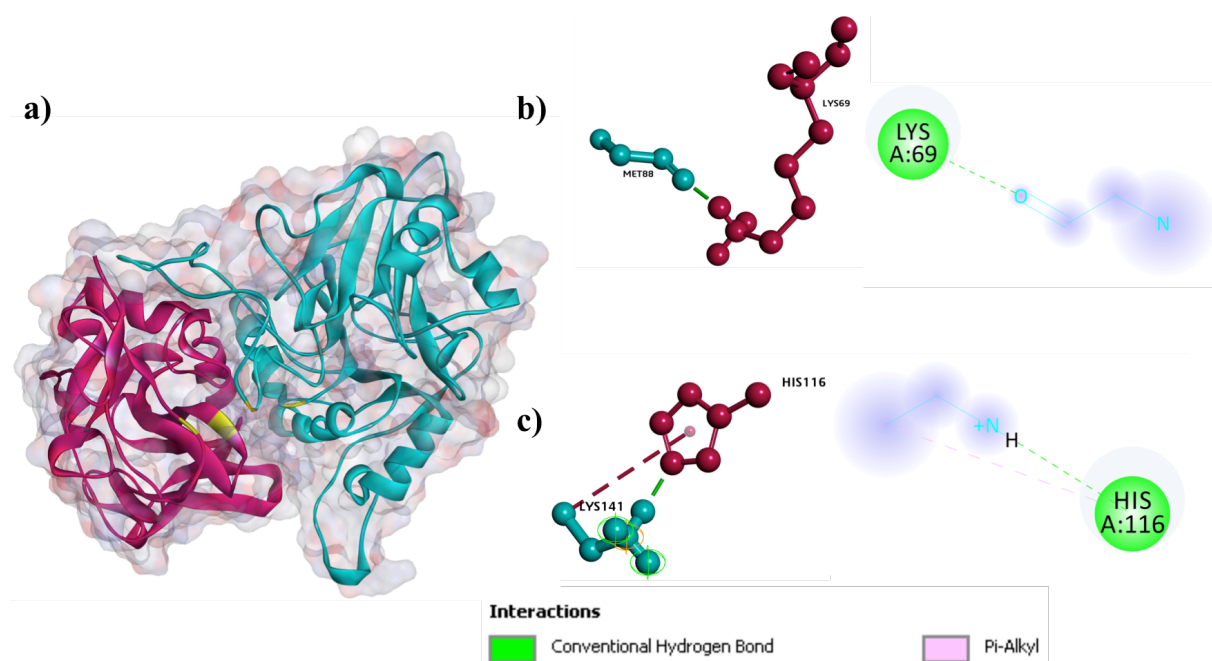


Figura 18. Docking entre Metallo hidrolase oxidoreductase e MpNEP2. **a)** superfície molecular com a estrutura do complexo: ligante Metallo hidrolase oxidoreductase (verde claro) – receptor MpNEP2 (rosa), destacando em amarelo a região de interação. **b)** representações da interação Met88-Lys69. **c)** representações das interações Lys141-His116.

4. DISCUSSÃO

4.1 Análise das sequências de proteínas NLPs de *M. perniciosa* revela regiões desordenadas e diferenças pós-traducionais

O sequenciamento do genoma de *M. perniciosa* (Mp), agente etiológico da vassoura-de-bruxa, evidenciou as sequências de DNA do fungo o que possibilitou o embasamento dos estudos moleculares, como a identificação de efetores importantes para o desenvolvimento do patossistema da vassoura-de-bruxa (MONDEGO et al., 2008). Mp foi o primeiro basidiomiceto a ter genes da família NLP identificados (GARCIA, et al. 2007). As cinco cópias identificadas parecem ser provenientes de transferência horizontal de espécies de oomicetos (como *Phytophthora* spp.) que coabitam em ambiente natural com Mp (TIBURCIO et al., 2010). Dessas cópias, *MpNep2* tem a maior expressão após os primeiros sinais de senescência do cacau, em estágio necrotrófico avançado (ZAPAROLI et al., 2011). Neste estudo buscou-se comparar a sequência da proteína MpNEP2 com as demais sequências presentes em Mp.

As sequências de MpNEPs possuem alta similaridade entre elas, compartilhando maior identidade as sequências de MpNEP2 com MpNEP3 e 4 (72.9 e 73 %) (Figura 1). Mesmo possuindo tamanha similaridade, até o momento não há associação das proteínas MpNEP3 e 4 ao patossistema da vassoura-de-bruxa ou nenhuma outra função identificada. O número de cópias de genes da família NLP pode variar de forma significativa entre os organismos e ainda possuir diversificação funcional durante processos biológicos. Por exemplo, o patógeno de trigo *Mycosphaerella graminicola* contém em seu genoma uma única cópia de NLP, já *Phytophthora sojae* possui 70 cópias, das quais 37 são pseudogenes e apenas oito relacionam-se a atividade indutora de necrose (DONG et al., 2012; FANG; PENG; FAN, 2017). Ou seja, a maioria dos genes são pseudogenes ou possuem funções diferenciadas. Esse fato pode ser sugerido também para as outras cópias dos genes NLP de Mp que não possuem relação com atividade necrotrófica ou envolvimento com a vassoura-de-bruxa, mencionado também por Zaparoli et al., 2011, que essas cópias são resultados de duplicações recentes que adquiriram funções diferentes ou se tornaram pseudogenes.

As sequências de NLP em Mp também podem ser diferenciadas devido as modificações pós-traducionais o que pode promover diferentes endereçamentos celulares e/ou funções distintas para as proteínas. Como pode ser observado na tabela 1, essas sequências se

diferenciam quanto aos sítios putativos de fosforilação e glicosilação, possuindo MpNEP2 menos sítios fosforilados que as proteínas comparadas, e a presença de aminoácidos glicosilados apenas em MpNEP1 e 5. Essa fosforilação e desfosforilação pode regular interações entre as proteínas, a estabilidade proteica, a localização celular e principalmente regular atividade (FERREIRA et al., 2013). A glicosilação também tem um papel significativo no endereçamento de proteínas. Sugerindo que as posições e quantidades dessas modificações podem diferenciar o destino e função dessas proteínas.

A sequência de peptídeo sinal está presente nas sequências de MpNEP1, 2 e 3, mas apenas MpNEP2 é secretada (GARCIA, et al., 2007), o que foi confirmado com análise pelo MultiLoc demonstrando localização celular extracelular, somado ao pI ácido que é característico para este tipo de localização (DORE et al., 1991). Embora outras sequências possuam peptídeo sinal (MpNEP1 e 3) e pI ácido (MpNEP1 e 5), todas as sequências comparadas, exceto MpNEP2, foram preditas como proteínas vacuolares. A presença de peptídeo sinal nas sequências das proteínas vacuolares podem indicar direcionamento à organela na célula e não necessariamente para o meio extracelular. O peso molecular entre as proteínas variam de 24-26 kDa que está de acordo com características gerais para família NLP (PEMBERTON; SALMOND, 2004; GIJZEN; NURNBERGER, 2006).

Outra abordagem comparativa para essas sequências de MpNEPs, realizada pelo presente estudo, foi a identificação de prováveis regiões de desordem nessas proteínas (Figura 2). Foi revelado que a maior parte dos sítios preditos de possíveis desordens está localizada em regiões de similaridade entre as cinco sequências (Figura 3). As regiões intrinsecamente desordenadas normalmente exibem atividades biológicas, e sua flexibilidade proporciona o reconhecimento de diferentes proteínas, ácidos nucleicos entre outros tipos de parceiros, que podem interagir acelerando reações ou interações químicas (SHIGEMITSU; HIROAKI, 2018). A p53 é um exemplo clássico de proteína com domínios de IDPs que podem interagir com uma fração de diferentes proteínas (OLDIFIELD; DUNKER, 2014). É uma família de proteínas cuja função está relacionada com a regulação do ciclo celular atuando na proliferação, diferenciação e morte celular (LEE et al., 2014). Apesar das MpNEPs possuírem regiões mais curtas com predição de desordem, pode ser indício de que essas proteínas possam interagir com uma diversa gama de proteínas que favoreçam os distintos estímulos na planta.

4.2 Potenciais alvos de interações de MpNEP2 no *T. cacao*

Apesar de já ter sido identificado membros da família NLP em diversos microrganismos, a ação molecular dessas proteínas ainda não foi completamente elucidada nos patossistemas. A abordagem que propomos neste trabalho, de identificar alvos moleculares que interagem com MpNEP, abre as possibilidades de definir o mecanismo pelo qual MpNEP2 induz repostas moleculares em *T. cacao*. O sistema de captura proposto por Pirovani et al 2010, permitiu selecionar potenciais alvos de interação para MpNEP2. As proteínas capturadas foram identificadas e os peptídeos obtidos mostraram 100 % de probabilidade para metalo hidrolase oxidoredutase, superfamília ENTH ANTH VHS e 11-beta-hidroxisteroide desidrogenase (HSD) em CCN51, 99,8 %, para fator de resposta a auxina, 73,2 % para esfingosina quinase e 63,4 % para tipo formina em Catongo (Tabela 2). Os alinhamentos dos peptídeos em bancos de dados do cacau (CocoaGenDB) e NCBI possibilitaram confirmar as identificações.

A partir das análises de ontologia gênica pelos *softwares* BinGO e Blat2Go, verificou-se os possíveis processos biológicos que as proteínas estão envolvidas, bem como as funções celulares e suas associações. Vale destacar, dentre as proteínas capturadas em extrato de cacau CCN51, a proteína da superfamília ENTH ANTH VHS está relacionada com funções de ligação a clatrina e atividade redutase, em processos de revestimentos de clatrina e oxirredução, respectivamente (Tabela 3). Especialmente ENTH/ANTH (adaptadores) são domínios que participam de processos mediados por clatrina (LEGENDRE-GUILLEMIN et al. 2004), que dirige a formação de vesículas endocíticas (MC PHERSON et al., 2001; CONNER; SCHMID, 2003; CHEN et al., 2011). Essas vesículas endocíticas a partir de clatrina são formadas, dentre outras funções, para o transporte de proteínas e a endocitose (HOLSTEIN; OLIVIUSSON, 2005). Como foi observado por meio de proteína ortóloga (AT1G03050), ENTH ANTH VHS pode associar-se diretamente a proteínas com função de endocitose e tráfico vacuolar (Figura 6 – cluster 4).

A endocitose em plantas promove a internalização ou absorção de proteínas da membrana ou moléculas extracelulares para o interior das células, possuindo uma série de compartimentos de vesículas, promovendo papel de fundamental importância na comunicação célula-célula e respostas celulares aos estímulos externos (MURPHY et al., 2005). A montagem dessas vesículas de endocitose pode ocorrer por meio da junção de adaptadores com a vesícula revestida de clatrina, que após estarem maduras se destacam da membrana

plasmática e entram no citosol (FAN et al., 2015). As dinaminas e proteínas relacionadas (grande família GTPase) medeiam a tubulação de membrana e a separação da vesícula formada (FAN et al., 2015).

O tráfego endocítico de plantas funciona também como um processo dinâmico relacionado à resposta imune, no qual essas vesículas são desviadas aos locais de infecção (LU et al., 2012; LARROQUE et al., 2013). E a interferência de reguladores essenciais para o tráfego tem demonstrado ser fundamental para o aumento da virulência do patógeno (BEN KHALED et al., 2015; TORUNO et al., 2016). FL2 em *Arabidopsis* é um receptor de reconhecimento de flg22 (peptídeo ativo da flagelina bacteriana), e uma mutação no gene que codifica um tipo de dinamina, prejudicou a endocitose induzida pelo FL2 e a resposta PTI, intensificando a produção Ca^{2+} citosólico e ROS (SMITH et al., 2014). Além disso, o efector AVR3a de *P. infestans* alterou a resposta PTI via complexo montador de membrana de endocitose e tráfego de vesícula (GARCIA-CHAPARRO et al., 2015). Dessa forma, a alteração de proteínas que participam na montagem de vesículas endocíticas interfere em processos de defesa primária da planta durante a infecção por patógeno, aumentando dessa forma sua virulência.

A associação entre o complexo de endocitose mediado por clatrina (CME) e proteínas indutoras de necrose e etileno (NLPs) já foi realizado por Arenas et al 2010. No estudo, as proteínas NLPs do patógeno necrotrófico *Botrytis cinerea* (BcNeps) foram infiltradas em folhas de *Nicotiana benthamiana* com inibidores farmacológicos, relatados por interferir na endocitose, função do citoesqueleto, tráfego de vesícula, morte celular apoptótica, morte celular necrótica, atividade da proteína quinase e suprimento de energia celular. Dentre os compostos testados, apenas dynasore foi capaz de reduzir a ação indutora de necrose por BcNep1. Esse fármaco bloqueia a construção de vesículas revestidas de membrana, inibindo dessa forma vias endocíticas, conhecidas por dependerem de dinamina (ARENAS et al., 2010). Esses autores sugeriram que BcNep1 pode entrar na célula por via de endocitose mediada por dinamina.

Para MpNEP2 ainda não há relatos associando a esse complexo. Contudo, esse estudo revelou que a proteína pode interagir com adaptadores (ENTH/ANTH) que são chave no tráfego celular e remodelamento de membrana (na formação de vesículas) envolvida na endocitose de plantas. Isto sugere que, diferentemente da BcNep1, MpNEP2 ao interagir com esses adaptadores pode estar interferindo na regulação do tráfego endocítico, como de receptores de reconhecimento padrão transmembranares, influenciando desse modo na

resposta imune do hospedeiro (SU et al., 2013; SMITH et al., 2014; GARCIA-CHAPARRO et al., 2015; GU et al., 2017). Em conjunto, esses resultados sugerem que *M. pernicioso* pode utilizar estratégias como *P. infestans*, outro patógeno necrotrófico, que produz efetores que induzem a resposta imune do hospedeiro via complexo endocítico e de transporte de proteínas.

As proteínas HSD e metalo hidrolase oxidoreductase, também capturadas em CCN51, ainda são pouco estudadas. HSD é um membro da superfamília de desidrogenase redutase de cadeia curta (BAUD et al., 2009) que tem homologia com a desidrogenase de animal. Essas proteínas convertem glicocorticoides inativos em glicocorticoide ativo, como o cortisol, podendo portanto amplificar os níveis e atividades locais dos glicocorticoides (CHAPMAN et al., 2013). Em plantas, essa proteína é pouco caracterizada, mas sabe-se que possui atividade dependente de NADP (D'ANDREA et al., 2007), em provável processo de oxi-redução, como mostrado em resultados obtidos pelo Blast2Go neste estudo (Tabela 3). Além disso, quando superexpresso em *A. thaliana*, HSD produz efeitos similares aos provocados por brassinosteroides (BRs), como o aumento do crescimento, ramificação e produção de flores, favorecendo hastes mais espessas e maior tolerância ao estresse (LI et al., 2007). Também pode ter relações com outros hormônios como auxina, ABA, ácido jasmônico e etileno, como BRs possuem (KRISHNA, 2003; SASSE 2003). Essa proteína, de acordo com os dados encontrados, parecem associar-se diretamente com Acetil CoA carboxilase, com 3-hidroxi-butirato desidrogenase, proteínas multifuncionais e glicinas desidrogenases (Figura 6 – cluster2), por meio das quais podem favorecer processos metabólicos de proteínas na célula vegetal. A metalo hidrolase oxireductase é uma família que possui proteínas importantes que atuam sobre substratos de ácidos nucleicos, envolvidos em processos de reparo e processamento de RNA (CALLEBAUT et al., 2002). A partir de análise com ortólogo dessa proteína foi verificado possível associação com DNA polimerase lambda, proteína mais representativa entre clusters 5 e 3 (Figura 6). Como foi identificado a MpNEP2 em CCN51 pode interagir com proteínas HSD5 e metalo hidrolase. Essas sabidamente interferem em diferentes processos, como processos metabólicos, catabólicos de proteínas e processos metabólicos do DNA, o que pode induzir rotas sinalizadoras distintas na planta.

A esfingosina quinase (SPHK1), capturada por MpNEP2 em extrato de cacau Catongo, foi predita com atividades quinase, de ligação ao ATP e ao ácido fosfatídico. Essa proteína está envolvida em uma série de possíveis processos, como metabólico de esfingolipídios, germinação de sementes, regulação da metáfase mitótica / transição

anafásica, processos catabólico dependente de complexo que promove a anáfase, fosforilação lipídica e resposta celular ao estímulo do ácido abscísico (Tabela 3). Especificamente a SPHK1 é um membro da família DAG quinase, que catalisa a formação de esfingosina-1-fosfato (S1P) e fito-S1P, a partir da fosforilação da esfingosina e fítoesfingosina, respectivamente (WORRALL et al., 2008; STRUB et al., 2010). Os metabólitos de esfingolípídeos são reguladores dinâmicos de muitos processos celulares fundamentais para os organismos eucariontes (PATA et al., 2010). Dentre os processos, é válido salientar que os níveis alterados de esfingolípídios podem promover a produção de espécies reativas de oxigênio seguida de morte celular programada, cujo mecanismo bioquímico ainda precisa ser elucidado (SHI et al., 2007; WANG et al., 2008; SAUCEDO-GARCÍA et al., 2011). Sabe-se que a esfingosina inibe a proliferação celular, favorecendo a apoptose, contrapondo a esfingosina-1-fosfato (S1P) que estimula o crescimento e suprime a morte celular, por isso esses metabólitos de esfingolípídios têm papel fundamental na proliferação, sobrevivência e morte celular (MACEYKA et al., 2002). Alden et al., 2011 demonstraram em estudo com células em suspensão de *Arabidopsis*, o envolvimento de S1P e SPHK1 na morte celular programa tipo apoptose (AL-PCD). Nesse estudo, células tratadas com S1P ativas foram submetidas ao estresse térmico. Verificou-se que a ação de S1P atenuou em até 50% a morte celular programada comparada ao controle (ALDEN et al., 2011). Inibidores de SPHK1 também foram testados em células em suspensão e foi observado o aumento significativo de AL-PCD (ALDEN et al., 2011). Denotando a relação de S1P e SHK1 com a regulação da morte celular programada em plantas.

Mais recentemente, foram relatados os esfingolípídios glicosilinositol fosforilceramida (GIPC) como receptores de NLP, visto que mutantes de plantas dicotiledôneas com composição modificada de GIPC foram mais resistentes ao tratamento com NLP (LENARCIC et al., 2017). Apesar de todas as plantas possuírem GIPC, as monocotiledôneas são insensíveis à ação de NLP (BAILEY, 1995), diferentemente das dicotiledôneas que possui constituição de GIPC tanto no comprimento da cadeia quanto na arquitetura, que favorecem a citotoxicidade pela NLP (LENARCIC et al., 2017). Glicosilinositol fosforilceramida é uma das quatro classes de esfingolípídios em plantas (PATA et al., 2010). Coletivamente, as pesquisas acerca de GIPC e nossos resultados, sugerem que ao ocorrer a associação entre MpNEP2 e esfingosina quinase a ação desta enzima seja inibida. Como resultado, ocorre o acúmulo de esfingolípídios (de cadeia longa não fosforilados) na célula o que induz influxos de cálcio do retículo endoplasmático (ER) e a geração de ROS, podendo promover morte celular

programada (FELLBRICH et al. 2002, JENNINGS et al. 2001, SCHOUTEN et al. 2008, SILVA et al. 2011). Estudos complementares necessitam ser realizados visando testar essa hipótese.

Neste estudo também foi relatado a interação de MpNEP2 com o fator de transcrição de resposta a auxina (ARF), que está diretamente associado com a regulação da transcrição e via de sinalização ativada por auxina (Tabela 3). Os ARFs são específicos de plantas e respondem ao estímulo do fitormônio auxina, envolvido em quase todos os processos de desenvolvimento da planta, desde a embriogênese até a senescência (LI et al., 2016). Essa regulação, envolvendo esses fatores, é chamada de ‘modelo canônico de sinalização de auxina’, no qual em níveis reduzidos de auxina, os Aux/IAAs interagem com determinados ARFs, impedindo a expressão de genes alvos (WANG; ESTELLE, 2014; WEIJERS; WAGNER, 2016; GALLI et al., 2018). Por outro lado, em níveis elevados de auxina a mesma promove a ligação entre Aux/IAAs e SCFTIR1/AFBE3, que destina a degradação de Aux/IAAs (repressivos), proporcionando a ativação de genes a partir de ARFs (WANG; ESTELLE, 2014; WEIJERS; WAGNER, 2016; GALLI et al., 2018). A análise com ortólogo de ARF demonstrou associação direta com as IAA33, IAA32, IAA26, IAA5 (Figura 6 – cluster 6), que atuam como proteínas repressoras em baixas concentrações de auxina, o que pode estar associado ao ‘modelo canônico de sinalização de auxina’. Os componentes desse processo de regulação pertencem a famílias multigênicas, isso pode ser alguma das explicações de como uma simples via pode regular uma ampla gama de diferentes processos de desenvolvimento das plantas (ROOSJEN et al., 2018). *Theobroma cacao*, por exemplo, possui 19 genes codificadores de ARFs (MUN et al 2012).

O perfil hormonal da vassoura-de-bruxa do *T. cacao*, no estágio de vassoura verde, revelou que os genes de resposta à auxina primária GH3, Aux / IAA, SAUR foram significativamente mais expressos (TEIXEIRA et al., 2014). Esse mesmo estudo identificou também que genes que codificam membros da classe de transportador de auxina (PIN e PILS) foram diferencialmente expressos (TEIXEIRA et al., 2014). Sugerindo que durante a vassoura verde há alteração dos níveis de auxina. E elevados níveis de auxina podem favorecer a transição de fase (biotrófica para necrotrófica) e desenvolvimento de *M. perniciosa* agente causal da vassoura-de-bruxa (KILARU et al., 2007). Evans 1980 também associou o patossistema com a presença de níveis alterados de auxina e propôs que a primeira fase da doença é indutora de auxina e favorece a modificações fisiológicas e morfológicas no *T. cacao* e a fase secundária de redução de auxina ativa vias de sinalização que provoca morte

no hospedeiro. Nesse sentido, as proteínas ARFs sabidamente induzem diferentes rotas de sinalização hormonal, ativado por auxina (CHANDLER, 2016). Um exemplo de como essa regulação pode interferir em outros hormônios, foi o teste realizado com flores de *Dianthus caryophyllus* tratadas com auxina exógena que induziu a produção de etileno, a murcha e a senescência de algumas flores sensíveis ao etileno (VAN STADEN, 1995).

Alguns patógenos regulam a resposta imune da planta por intermédio de efetores que interagem com fator de transcrição responsivo a auxina, favorecendo a colonização na planta. Isso pode ser visto com efetores (10A07) do nematoide *Heterodera schachtii*, patógeno de beterraba sacarina, que interfere na transcrição de genes do hospedeiro por meio da interação com IAA16 (*INDOLE-3-ACETIC ACIDINDUCIBLE16*) aumentando a suscetibilidade na planta (HEWEZI et al., 2015). Uma quinase da planta (IPK) fosforila 10A07 que medeia seu tráfego do citoplasma para o núcleo onde possivelmente realiza essa regulação (HEWEZI et al., 2015). Os efetores podem realizar o direcionamento dos fatores de transcrição ou repressores transcricionais, provocando modificação em sua estrutura e localização subcelular, e bloqueando sua atividade (TORUNO et al., 2016).

No patossistema vassoura-de-bruxa há uma série de modificações moleculares, bioquímicas e fisiológicas no *T. cacao*, ocasionadas por respostas a estímulos, dentre os quais elicitores do fungo, como MpNEPs (SCARPARI et al., 2005; CEITA et al., 2007; MEINHART et al., 2008; SOUZA et al., 2018). A possibilidade de interação de MpNEP2 com ARF, fator importante na via de sinalização, sugere que possa interferir na transcrição de genes alvo, favorecendo a doença para uma possível necrose. No entanto essa associação necessita ser investigada. Visto que ARFs tem funções redundantes que podem ser compensatórias (CHANDLER, 2016).

Outro alvo capturado por MpNEP2 em Catongo neste estudo, foi a proteína tipo formina (Fh5), a qual foi predita estar envolvida no desenvolvimento do endosperma, nucleação de actina e morfogênese (Tabela 3). Ainda por meio de rede de interação, utilizando ortólogo da proteína, foi observado associação direta de Fh5 com actina 12, que desempenha função central no fluxo citoplasmático – determinação da forma celular; no movimento de organelas e na extensão (Figura 6 – cluster 1). A formina é membro de uma família de grande número de proteínas, que é chave na regulação da polimerização dos filamentos de actina e dos processos dependente de actina (PAUL; POLLARD, 2009; GISBERGEN; BENZANILLA, 2013). Os organismos possuem muitas isoformas que parecem ter funções distintas para cada tipo de tecido e célula, entretanto o que todas têm em

comum é associação direta com a membrana plasmática (GISBERGEN; BENZANILLA, 2013). O citoesqueleto de actina, polimerização e despolimerização, tem sido citado como um regulador de sinalização para a resposta imune inata, no entanto ainda é um processo pouco conhecido em organismo vegetal. Muitas respostas do hospedeiro para o patógeno, como remodelamento citoplasmático e secreção de componentes de defesa para o local de infecção, são processos que dependem de reestruturação de actina (SCHMIDT; PANSTRUGA, 2007). Quando esse citoesqueleto é perturbado a planta se torna mais suscetível (HENTY-RIDILLAL et al., 2013). Por exemplo, HopW1 é um efector do patógeno *Pseudomonas syringae* que interfere diretamente no citoesqueleto de actina e essa associação é necessária para a virulência da bactéria para com a planta (KANG et al., 2013). Portanto, propõe-se que a interação de MpNEP2 com proteína tipo formina do cacau Catongo pode interferir na polimerização e despolimerização do filamento de actina e proporcionar aumento da virulência de *M. perniciosa* no cacau.

4.3 A interação entre MpNEP2 e seus alvos ocorre em resíduos de aminoácidos essenciais para desencadear necrose

A captura de proteínas *in vitro* permitiu selecionar alvos de interação da MpNEP2. Para validar essas interações, foi realizado ensaio *in silico* de *docking* entre essas proteínas. Visto que a proteína de necrose MpNEP2 de *M. perniciosa* possui modelo cristalografado por Zaparoli et al. (2011) e no entanto as proteínas de *T. cacao* capturas ainda não possui estrutura descrita de acordo com o banco de dados de proteínas (PDB), no presente estudo foi necessário obtenção de modelos 3D a partir de modelagem por homologia pelo SWISS MODEL.

As validações de modelos preditos realizadas pelo programa PROCHECK presume-se que os aminoácidos constituintes se encontrem 90 % em regiões muito favoráveis e favoráveis (LASKOWSKI et al., 1993). Utilizando o software ProSA (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007) foi possível verificar a qualidade da estrutura 3D, pois destaca regiões de maior ou menor energia coloridas de azul à vermelho em ordem crescente de energia residual, na qual as regiões de possíveis erros (choque atômico) possuem maior energia na predição do modelo. Ainda permite explorar a integridade da construção predita comparando com outras cadeias proteicas determinadas experimentalmente no PDB, atribuindo valores de Z-score que

tende a ser negativo quando o modelo construído alcançou uma boa estrutura. Os modelos obtidos encontraram-se dentro dos padrões de verificação de estrutura proposto pelo PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) e ProSA (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). Todas as estruturas 3D preditas possuíram mais de 90% dos resíduos de aminoácidos em regiões muito favoráveis e favoráveis apresentado pelo gráfico de Ramachandran. Além disso, exibiram mais regiões de menor energia, com poucos resíduos de possíveis choques atômicos e Z-score negativos, características de uma boa estrutura (Figuras 7-12, a-d). Verificações adicionais foram realizadas para validar os modelos, obtendo resultados satisfatórios (material suplementar 1).

O *docking* entre MpNEP2 (ligante) e a proteína da superfamília ENTH ANTH VHS (receptor) de cacau, apresentou interações em aminoácidos de atividade em ambas proteínas. Ligações de hidrogênio, pi-sigma e de sal ocorreram entre os resíduos de His116;Lys69 do ligante e Thr24; Glu242; Asn174 no domínio ANTH do receptor (Figura 15).

O aminoácido His116 é um dos resíduos que compõem o heptapeptídeo (GHRHDWE) conservado na região central do domínio NPP1 em todas as proteínas NLP (GIJZEM; NURNBERGER, 2006). Esse resíduo é importante para atividade necrótica da MpNEP2, como foi testado por Zapparoli et al., 2011 em uma substituição por alanina ou serina, que foi capaz de comprometer atividade dessa proteína. Lys69 é um aminoácido que está em uma região predita neste estudo como desordenada, podendo ser um novo sítio de interação para MpNEP2. Pois resíduos em região de desordem podem exercer atividades, funcionando como reconhecimento molecular, montagem molecular, modificações de proteínas ou cadeia entrópica (LEE et al., 2014). Vale ressaltar que a região com mais resíduos de possíveis desordem da MpNEP2 estão na alça entre os aminoácidos 62-80 (Figura 3). O domínio do receptor ANTH contém sequência de aminoácidos com atividade mediadora de processos dependentes de clatrina (HOBSTEIN; OLIVIUSON, 2005).

Interações em aminoácidos possivelmente importantes para atividade de MpNEP2 ocorreram também entre os complexos 11-beta hidroxisteroide desidrogenase (receptor) - MpNEP2 (ligante) por meio de ligação Pi-cation entre Arg294-His116 (Figura 14c) e Pi-Alkyl entre Val300-Trp64 (Figura 14b). Trp64 está na região predita de desordem e podendo também ser um novo sítio de interação para MpNEP2, relatado aqui. E Metalo hidrolase oxidoreductase (ligante)-MpNEP2 (receptor) em ligações de hidrogênio nos aminoácidos Met88-Lys69 (Figura 18b), ligações de hidrogênio e Pi-alkyl entre Lys141-His116 (Figura 18c).

Membros da família de proteínas 11-beta hidroxisteroide desidrogenase normalmente compartilham domínios hidrofóbico N-terminal, de ligação ao NADPH e de ligação ao esteroide (OPPERMANN et al., 2001; PINNING, 2003). No entanto não houve interação nesses domínios previstos. Contudo ocorreu interação no resíduo Lys141 da metalo hidrolase oxidoreductase, que está localizado em uma região de domínio Lactamase B2 predito pelo *Interpro*.

Para o complexo esfingosina quinase (receptor)-MpNEP2 (ligante) a interação também ocorreu no resíduo imprescindível para atividade do ligante, entre os aminoácidos Lys401-His116 por ligações Pi-cation e Pi-alkyl (Figura 16b). Fator de resposta a auxina (ligante)-MpNEP2 (receptor) ligações Pi-Alkyl entre os aminoácidos Arg182-Trp64 (Figura 13b) e ligações de hidrogênio entre Val170-Trp348 e Pro169-Trp348 (Figura 13c). O resíduo Arg182 está localizado em domínio B3 de ligação ao DNA, de acordo com Boer et al. (2014) e *Interpro*. Esse domínio está presente em todos ARFs na região N terminal, continuado por uma região intermediária (MR) que regula a ativação ou repressão de genes alvo pelo ARF (TIWARI et al., 2003). Além disso, Val170 e Pro169 de MpNEP2 são aminoácidos da tríade proposta por Zapparoli et al., (2011) de uma alça hidrofóbica que tem atividade eletrolítica e de necrose.

A interação com a proteína entre Tipo formina (ligante)-MpNEP2 (receptor) ocorreu em Phe521-Gly20; Phe522-Val22 por ligações de hidrogênio (Figura 17b); Val535-Asp210; Trp536-Asp210 e ligações Pi-alkyl em aminoácidos Met534-His116; Val535-His116 (Figura 17c). Os resíduos Phe521, Phe522 VAL535 e TRP536 são componentes do domínio conservado FH2 que medeiam processos que envolvam a actina ou de interação à actina (WALLAR; ALBERTS, 2003; ZIGMOND, 2004). Este domínio geralmente está presente na região carboxi-terminal a um domínio FH1 que é enriquecido com prolina (OTOMO et al., 2005).

Como discutido, o *docking* de todos os complexos ocorreram em sítios importantes para atividade necrotrófica da MpNEP2 e para maior parte das proteínas identificadas, em resíduos de diferentes atividades. Com base nisso, propomos que as proteínas em estudo são alvos moleculares para MpNEP2 interferir no tráfego endocítico de receptores de reconhecimento, na regulação de genes para sinalização hormonal e no acúmulo de esfingolípídeos, elicitando por diferentes vias desde uma resposta imediata à uma resposta mais intensa do hospedeiro que provoca morte celular em tecidos infectados por Mp.

5. CONCLUSÕES

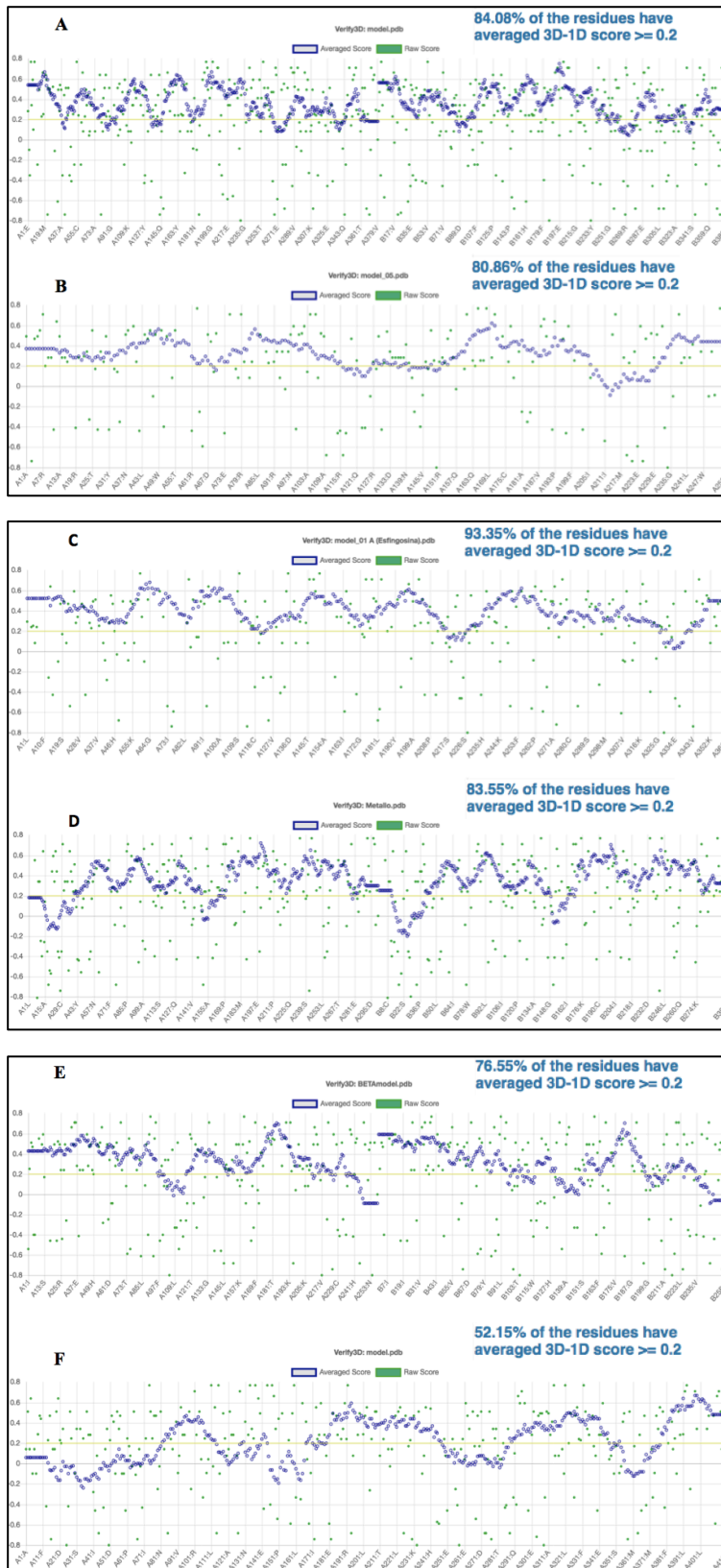
O presente estudo é o primeiro relato com alvos de interação da MpNEP2 com proteínas do *T. cacao* em abordagens *in silico* e *in vitro*. MpNEP2 pode interagir com metalo hidrolase oxidoredutase, superfamília ENTH ANTH VHS, 11-beta-hidroxiesteroide desidrogenase, fator de resposta a auxina, esfingosina quinase e tipo formina. O que sugere que durante interação *M. perniciosa:T. cacao* o efector MpNEP2 do fungo interfere em vias metabólicas, endocíticas e tráfego de membrana, de transcrição de genes, na fosforilação de esfingolipídios e no citoesqueleto da célula na modulação dinâmica da actina, do hospedeiro. Esses processos podem regular a resposta imune da planta favorecendo a colonização do patógeno e o avanço da doença para possível necrose. Esse efector tem o potencial de interferir em diferentes vias interagindo com diferentes proteínas e pode ser um componente chave para a virulência do fungo.

Além disso, todas as sequências de MpNEPs possuem possíveis regiões de desordem. Essas regiões de desordem previstas para MpNEP2 podem oferecer maior flexibilidade em suas funções sobre o patossistema da vassoura de bruxa.

Material suplementar

Verificação da compatibilidade dos modelos 3D com as suas próprias sequências de aminoácidos (1D) e comparação dos resultados com boas estruturas.

Material suplementar 1: Modelos ARF (A), proteína da superfamília ENTH ANTH VHS (B), esfingosina quinase (C), metalo hidrolase (D), beta-hidroxiesteroide (E) e proteína tipo formina.



6. REFERÊNCIAS

- ALDEN, K. P. et al. Sphingolipid long chain base phosphates can regulate apoptotic-like programmed cell death in plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 410, 574–580, 2011.
- ALMEIDA, J. G. et al – Membrane proteins structures: A review on computation modeling tools. **ELSEVIER**. 2017.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI- BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. 25, 3389– 3402, 1997.
- ARENAS, Y. C. et al. Functional analysis and mode of action of phytotoxic Nep1-like proteins of *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 74, 376-386, 2010.
- BAILEY, B. A. "Purification of a Protein from Culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that Induces Ethylene and Necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*." **Phytopathology**. 85, 1250-1255, 1995.
- BAUD, S. et al. Regulation of HSD1 in Seeds of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiology**. 50, 1463–1478, 2009.
- BENKERT, P., BIASINI, M., SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**. 27, 343-350, 2011.
- BEN KHALED, S; POSTMA, J; ROBATZEK, S. A moving view: subcellular trafficking processes in pattern recognition receptor-triggered plant immunity. **Annual Review Phytopathology**. 53, 379–402, 2015.
- BERTONI, M. et al. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. **Scientific Reports** 7, 2017.
- BIENERT, S. The SWISS-MODEL Repository - new features and functionality. **Nucleic Acids Research**. 45, 313-319, 2017.
- BLOM, N.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Sequence and Structure-based Prediction of Eukaryotic Protein Phosphorylation Sites. 1999.
- BLUM, T.; BRIESEMEISTER, S.; KOHLBACHER, O. MultiLoc2 : integrating phylogeny and Gene Ontology terms improves subcellular protein localization prediction. 11, 1–11, 2009.
- BOER, D. R. et al. Structural Basis for DNA Binding Specificity by the Auxin-Dependent ARF Transcription Factors. **Cell**. 156, 577–589, 2014
- BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review Plant Biology**. 60, 379–406, 2009.

- BOWIE, J. U.; LUTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**. 253,164-70, 1991.
- CALLEBAUT, I. et al. Metallo- β -lactamase fold within nucleic acids processing enzymes the β -casp family. **Nucleic Acids Reseach**. 30, 3592-3601, 2002.
- CEITA, G.O.C.; MACÊDO, J.N.A.; SANTOS, T.B et al. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa* . **Plant Science**. 173, 106-117, 2007.
- CHANDLER, J. W. Auxin response factors. **Plant, Cell and Environment**. 39, 1014–1028, 2016.
- CHAPARRO-GARCIA, A. et al. *Phytophthora infestans* RXLR-WY Effector AVR3a Associates with Dynamin-Related Protein 2 Required for Endocytosis of the Plant Pattern Recognition Receptor FLS2. **PLoS ONE**. 10, 1-27, 2015.
- CHAPMAN, K.; HOLMES, M.; SECKL, J. 11-Hydroxysteroid Dehydrogenases: Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action. **Physiology Review**. 93,1139–1206, 2013.
- CHEN, X. et al. Clathrin-mediated endocytosis: the gateway into plant cells. **Current Opinion in Plant Biology**. 14, 674–682, 2011.
- CONNER, S. D.; SCHMID, S. L. Differential requirements for AP- 2 in clathrin-mediated endocytosis. **Journal Cell Biology**. 162, 773-780, 2003.
- DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**. 11, 539–548, 2010.
- DONG, S. et al. The NLP toxin family in *Phytophthora sojae* includes rapidly evolving groups that lack necrosis-inducing activity. **Molecular Plant-Microbe Interaction**. 25, 896–909, 2012.
- DORE, I. et al. Subcellular localization of acidic and basic PR proteins in tobacco mosaic virus-infected tobacco. **Archives of Virology**. 120, 97–107, 1991.
- D’ANDREA, S et al. At5g50600 encodes a member of the short-chain dehydrogenase reductase superfamily with 11b- and 17b-hydroxysteroid dehydrogenase activities associated with *Arabidopsis thaliana* seed oil bodies. **Biochimie**. 89, 222–229, 2007.
- EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**. 74, 515-523, 1980.
- FAN, L. et al. Endocytosis and its regulation in plants. **Trends in Plant Science**. 1–10, 2015.
- FELLBRICH G, et al. NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. **The Plant Journal**.32, 375–390, 2002.
- FERREIRA, C. V. et al. Transdução de sinal. In: **A Célula**. 3rd. ed. [s.l.] Manole, 590, 2013.

GALLI, M. et al. The DNA binding landscape of the maize AUXIN RESPONSE FACTOR Family. **Nature Communications**. 9, 4526, 2018.

GARCIA, O. et al. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. **Mycological Research** 111, 443–455, 2007.

GASTEIGER, E. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. [s.l.] Springer, 2005.

GIJZEN, M.; NURNBERGER, T. Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. **Phytochemistry**. 67, 1800-18007, 2006

GISBERGEN, P. A.; BEZANILLA, M. Plant formins: membrane anchors for actin polymerization. **Trends Cell Biology**. 23, 227–33, 2013.

GU, Y.; ZAVALIEV, R.; DONG, X. Membrane Trafficking in Plant Immunity. **Molecular Plant**. 10, 1026–1034, 2017.

GUEX N, PEITSCH MC, SCHWEDE T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS- MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. **Electrophoresis**. 30, 162–173, 2009.

GUPTA, R.; JUNG, E.; BRUNAK, S. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins, 2004.

HENTY-RIDILLA, J. L. et al. The Plant Actin Cytoskeleton Responds to Signals from Microbe-Associated Molecular Patterns. **PLoS Pathogens**. 9, 2013.

HEWEZI, T. et al. The Cyst Nematode Effector Protein 10A07 Targets and Recruits Host Posttranslational Machinery to Mediate Its Nuclear Trafficking and to Promote Parasitism in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**. 27, 891–907, 2015.

HOGENHOUT, S. A et al. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. **Molecular Plant Microbe Interactions**, 22, 115-122, 2009.

HOLSTEIN, S. E. H.; OLIVIUSSON, P. Sequence analysis of *Arabidopsis thaliana* E/ANTH-domain-containing proteins: membrane tethers of the clathrin-dependent vesicle budding machinery. **Protoplasma**. 226, 13–21, 2005.

JENNINGS, J. C. et al. Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep1 from *Fusarium oxysporum*. **Plant Science**. 161, 891–899, 2001.

KAMOUN, S. "A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes." **Annual Review of Phytopathology**. 44, 41-60, 2006.

KANG, Y. et al. HopW1 from *Pseudomonas syringae* Disrupts the Actin Cytoskeleton to Promote Virulence in *Arabidopsis*. **PLOS Pathogens**. 10, 2014.

KIEMER, L.; BENDTSEN, J. D.; BLOM, N. NetAcet : prediction of N-terminal acetylation sites. 7, 1269–1270, 2005

KILARU, A.; BAILEY, B. A.; HASENSTEIN, K. H. *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. **FEMS Microbiol Letters**. 274, 238–244, 2007.

KOZAKOV, D et al. The ClusPro web server for protein–protein docking. **Nature Protocols** 12, 255–278, 2017.

KRISHNA, P. Brassinosteroid-mediated stress responses. **Journal of Plant Growth Regulation** 22, 289–297, 2003.

LARROQUE, M. et al. Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity and resistance to the root pathogen *Phytophthora parasitica* in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**. 64, 3615–3625, 2013.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereo- chemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**. 26, 283–291, 1993.

LEE, van der R. Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. **Chemical Reviews**. 144, 6589–6631, 2014.

LEGENDRE-GUILLEMIN et al. ENTH/ANTH proteins and clathrin-mediated membrane budding. **Journal of Cell Science**. 117, 9–18, 2004.

LENARCIC, T. et al. Eudicot plant-specific sphingolipids determine host selectivity of microbial NLP cytolysins. **Science**. 358, 1431–1434, 2017.

LI, J. et al. Capping protein integrates multiple MAMP signalling pathways to modulate actin dynamics during plant innate immunity. **Nature Communications**. 6, 7206, 2015.

LI, S-B et al. A Review of Auxin Response Factors (ARFs) in Plants. **Frontiers Plant Science**. 7, 47, 2016.

LU, Y. J. et al. Patterns of plant sub- cellular responses to successful oomycete infections reveal differences in host cell reprogramming and endocytic trafficking. **Cell Microbiol** 14, 682–697, 2012.

LUTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**. 356, 83–85, 1992.

MACEYKA, M et al. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate and apoptosis, **Biochimica et Biophysica Acta**. 1585, 193–201, 2002.

MACHO, A. P; ZIPFEL, C. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. **Molecular Cell**. 54, 263–272, 2014.

MCPHERSON, P. S., KAY, B. K. AND HUSSAIN, N. K. Signaling on the endocytic pathway. **Traffic** 2, 375–384, 2001.

- MEINHARDT, L. W. et al. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? **Molecular Plant Pathology**. 9, 577–588, 2008.
- MITCHELL, A. L. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. **Nucleic Acids Research**. 2019.
- MONDEGO, J. M. C. et al. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches Broom Disease of cacao. **BMC Genomics**. 9, 548, 2008.
- MUN, J. H. et al. Auxin response factor gene family in *Brassica rapa*: genomic organization, divergence, expression, and evolution. **Molecular Genetics and Genomics**. 287, 765–784, 2012.
- MURPHY, A. S. et al. Endocytotic cycling of PM proteins. **Annual Review Plant Biology**. 56, 221–251, 2005.
- OLDFIELD, C. J. ; DUNKER, A. K. Intrinsically Disordered Proteins and Intrinsically Disordered Protein Regions. **Annual Review of Biochemistry**. 83, 553–84, 2014.
- OLIVEIRA, G. A. P. et al. *Moniliophthora perniciosa* Necrosis- and Ethylene-Inducing Protein 2 (MpNep2) as a Metastable Dimer in Solution: Structural and Functional Implications. **PLoS ONE** 7, 45620, 2012.
- OPPERMANN, C.; FILLING, H.; JORNVALL, Forms and functions of human SDR enzymes, **Chemico Biological Interaction**. 130-132, 2001.
- OTOMO, T. et al. Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. **Nature**. 433, 2005
- PATA, M. O.; HANNUN, Y. A.; NG, C. K. Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. **New Phytology**. 185, 611–630, 2010.
- PAUL, A. S.; POLLARD, T. D. Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. **Cell Motil Cytoskeleton**. 66, 606–617, 2009.
- PEMBERTON, C. L., SALMOND, G. P. The Nep1-like proteins: a growing family of microbial elicitors of plant necrosis. **Molecular Plant Pathology**. 5, 353–359, 2004.
- PENNING, T. M. Hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation of steroid hormone action. **Human Reproduction Update**. 9, 193-205, 2003.
- PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nat Meth**. 10, 785–786, 2011.
- PIROVANI, C. P. et al. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. **Electrophoresis**. 29, 2391–2401, 2008.

- PIROVANI, C. P. et al. *Theobroma cacao* cystatins impair *Moniliophthora perniciosa* mycelial growth and are involved in postponing cell death symptoms. **Planta** 232, 1485–1497, 2010.
- RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**. 7, 95–99, 1963.
- ROMERO, P.; OBRADOVIC, Z.; DUNKER, A. K. Sequence data analysis for long disordered regions prediction in the calcineurin family. **Genome Informatics**. 8, 110–124, 1997.
- ROOSJEN, M.; PAQUE, S.; WEIJERS, D. Auxin response factors: output control in auxin biology. **Journal of Experimental Botany**. 69, 179–188, 2018.
- SANTANA, L. S. et al. *TcCYS4*, a cystatin from cocoa, reduces necrosis triggered by *MpNEP2* in tobacco plants. **Genetics and Molecular Research**. 13, 7636–7648, 2014.
- SASSE, J. M. Physiological actions of brassinosteroids: an update. **Journal of Plant Growth Regulation** 22, 276–288, 2003.
- SAUCEDO-GARCIA, et al. MPK6, sphinganine and the LCB2a gene from serine palmitoyltransferase are required in the signaling pathway that mediates cell death induced by long chain bases in *Arabidopsis*. **New Phytologist** 191, 943–957, 2011.
- SCARPARI, L. M. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. **Journal of Experimental Botany**. 56, 865–877, 2005.
- SCHMIDT, S. M.; PANSTRUGA, R. Cytoskeletal functions in plant–microbe interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 71, 135–148, 2007.
- SCHOUTEN, A; VAN BAARLEN, P.; VAN KAN, J. Phytotoxic Nep1-like proteins from the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* associate with membranes and the nucleus of plant cells. **The New Phytologist**. 177, 493–505, 2008.
- SCHWEDE, T. et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**. 31, 3381–3385, 2003.
- SHI, L et al. Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. **Cell Research** 17, 1030–1040, 2007.
- SHIGEMITSU, Y; HIROAKI, H Common molecular pathogenesis of disease-related intrinsically disordered proteins revealed by NMR analysis. **Journal Biochemical**. 163, 11–18, 2018.
- SILVA, L. F. et al. Expression of an oxalate decarboxylase impairs the necrotic effect induced by Nep1-like Protein (NLP) of *Moniliophthora perniciosa* in transgenic tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 24, 839–848, 2011.

- SMITH, J. M. et al. Sensitivity to Flg22 is modulated by ligand- induced degradation and de novo synthesis of the endogenous flagellin- receptor FLAGELLIN-SENSING2. **Plant Physiology**. 164, 440–454, 2014.
- SOUZA, J. T. et al. Cocoa diseases: witches’ broom. UMAHARAN, P. (ed.), **Achieving sustainable cultivation of cocoa**, Burleigh Dodds Science Publishing, Cambridge, UK, 2018.
- SOUZA, J. T. et al. Cocoa diseases: witches’ broom. UMAHARAN, P. (ed.), **Achieving sustainable cultivation of cocoa**, Burleigh Dodds Science Publishing, Cambridge, UK, 2018.
- STRUB, G.M. et al. Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 688, 141–155, 2010.
- SUN, Y. et al. Structural basis for flg22-induced activation of the Arabidopsis FLS2–BAK1 immune complex. **Science** 342, 624–628, 2013.
- SZKLARCZYK, D. et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**. 2015.
- TEIXEIRA, P. J. P. L. et al. High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Cell**. 26, 4245–69, 2014.
- TIBURCIO, R. A. et al. Genes acquired by horizontal transfer are potentially involved in the evolution of phytopathogenicity in *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri*, two of the major pathogens of cacao. **Journal of Molecular Evolution**. 70, 85-97, 2010.
- TIWARI, S.B.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. **Plant Cell**. 15, 533–543, 2003.
- TORUNO, T. Y.; STERGIOPOULOS, I.; COAKER, G. Plant-Pathogen Effectors: Cellular Probes Interfering with Plant Defenses in Spatial and Temporal Manners. **Annual Review Phytopathology**. 54, 419–441, 2016.
- VAN STADEN, J. Hormonal control of carnation flower senescence. **Acta Horticulturae**. 405, 232–239, 1995.
- VILLELA-DIAS, C. et al. Nep1-like protein from *Moniliophthora perniciosa* induces a rapid proteome and metabolome reprogramming in cells of *Nicotiana benthamiana*. **Physiologia Plantarum**. 150, 1–17, 2014.
- WALLAR, B. J.; ALBERTS, A. S. The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. **Trends Cell Biology** 13, 435–446 (2003).
- WANG, R.; ESTELLE, M. Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. **Current Opinion Plant Biology**. 21, 51–58, 2014.
- WANG, W. et al. An inositol phosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in *Arabidopsis*. **Plant Cell**. 20, 3163–3179, 2008.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**. 46, 296-303, 2018.

WEIJERS, D.; WAGNER, D. Transcriptional responses to the auxin hormone. **Annual Review of Plant Biology** 67, 539–574, 2016.

WIEDERSTEIN; SIPPL ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**. 35, 407-410, 2007.

WIRTHMUELLER, L.; MAQBOOL, A.; BANFIELD, M. J. On the front line: structural insights into plant–pathogen interactions. **Nature Reviews, Microbiology**. 11, 2013.

WORRALL, D. Involvement of sphingosine kinase in plant cell signaling. **The Plant Journal** 56, 64–72, 2008.

XUE, B.; Uversky, V. N. **Journal Molecular Biology**. 2013.

ZAPAROLI, G. et al. The crystal structure of Necrosis- and Ethylene-Inducing Protein 2 from the causal agent of cacao's witches' broom disease reveals key elements for its activity. **Biochemistry**. 50, 9901–9910, 2011.

ZIGMOND, S. H. Formin-induced nucleation of actin filaments. **Current Opinion Cell Biology** 16, 99–105, 2004.

5. CAPÍTULO 2

Indução *in vitro* de proteínas indutoras de necrose e etileno (MpNEP) em
Monilophthora perniciosa

RESUMO

Moniliophthora perniciosa (Mp) é um fungo hemibiotrófico que infecta *Theobroma cacao* provocando a doença vassoura-de-bruxa (VB). Dentre as proteínas produzidas pelo Mp durante o processo de interação, está a proteína indutora de necrose e etileno (NEP). A MpNEP é classificado em I, II e III de acordo com seus resíduos de cisteína. Os genes 1 e 2 são os mais expressos durante o desenvolvimento da doença VB e está relacionada à fase necrotrófica do fungo. Contudo a associação desses genes com a virulência do fitopatógeno é desconhecida. O presente estudo objetivou verificar se extratos complexos de cacau e tabaco induzem a produção da proteína MpNEP em micélio saprofítico de *M. perniciosa*. Os testes foram conduzidos com isolados diferentes de Mp (1441 e 4145) visando identificar se esta é uma resposta conservada independente do genótipo do patógeno. Os ensaios foram realizados com micélio saprofítico crescido na presença ou ausência de extrato vegetal do hospedeiro, cacau, ou de uma planta não hospedeira, tabaco. Após 14 dias de crescimento, os extratos proteico totais foram extraídos do micélio e do secretoma. Os *immunoblottings*, utilizando um anticorpo policlonal contra MpNEP, revelaram que ambos os extratos testados foram capazes de induzir o acúmulo de proteínas com peso molecular similar ao de MpNEP. A análise em lupa das hifas, crescidas na presença ou ausência dos extratos indutores, revelou que o extrato vegetal induz mudanças morfológicas no micélio. Além disso, foi possível identificar que o crescimento do Mp na presença de extrato de cacau induz mudanças na composição ou no arranjo dos componentes da parede celular visto que o fungo consegue manter o crescimento na presença de indutores de estresse em PC, como o SDS. Observou-se também uma resposta aumentada na atividade da enzima guaiacol peroxidase (GPX) quando o fungo cresce na presença de cacau. Essa enzima sabidamente tem a atividade relacionada com mudanças impostas na PC. Por se tratar de uma peroxidase também atua na detoxificação celular. Foi também nosso objetivo identificar o acúmulo diferencial de MpNEP em ramos infectados de cacau. A fim de determinar em que fase da doença MpNEP é acumulada, proteína total de cacau (de ápices caulinares) não infectado e três fases diferentes (vassoura verde, transição e “moranguinho”) da doença vassoura-de-bruxa foram obtidas. A maior abundância de MpNEP parece estar em uma fase antes do aparecimento de necrose (vassoura verde) no tecido infectado com cacau, conforme revelado no *western blot*. A possibilidade de indução *in vitro* de proteínas MpNEPs a partir de extrato vegetal e o maior acúmulo desta proteína em vassoura verde, contribui com novas perspectivas para o conhecimento dessas proteínas sob o contexto da vassoura-de-bruxa, ainda abre possibilidades para novos estudos com estratégias *in vivo* e *in vitro*.

1. INTRODUÇÃO

O fungo *Moniliophthora perniciosa* (Mp) é o agente causal da vassoura-de-bruxa em *Theobroma cacao*, árvore que produz amêndoas que são matéria-prima para o chocolate, produto amplamente consumido em todo o mundo, portanto uma cultura mundialmente relevante (RUSCONI; CONTI, 2010).

Mp é um basidiomiceto hemibiotrófico com dois estágios durante seu ciclo de vida, um biotrófico e outro necrotrófico ou saprofítico (EVANS, 1980). Durante a infecção no *T. cacao*, ao penetrar o tecido por aberturas naturais, se inicia o estágio biotrófico no qual as hifas monocarióticas se desenvolvem de forma lenta em espaços intercelulares, estimulando no hospedeiro modificações morfológicas, fisiológicas e moleculares (HOLLIDAY, 1980; MEINHARDT et al., 2008; SENA, et al., 2014). Essas alterações incluem sintomas de hipertrofia, hiperplasia e perda da dominância apical, formando ramos anormais que são chamados de “vassoura verde”. Com o avanço da infecção inicia um processo de necrose devido a mecanismos de resposta induzida. O fungo se desenvolve nas células necróticas sofrendo alterações nas hifas para uma forma dicariótica, se instalando o estágio necrotrófico ou saprofítico, formando a “vassoura seca” (KILARU; HASENSTEIN, 2005; TEIXEIRA, et al., 2015). A infecção do fungo em almofadas florais do cacau leva a formação de vassouras almofadadas, que são estruturas de flores atípicas que produzem frutos pequenos, tipo morango (OLIVEIRA; LUZ, 2007).

Durante essa interação, o fungo libera moléculas efetoras que são imprescindíveis para sua patogenicidade, dentre as quais estão proteínas indutoras de necrose e etileno (NEP) ou *Nep-like proteins* (NLP). As NLPs são uma família de proteínas de 24 a 26 kDa que compartilham um domínio heptapeptídeo (GHRHDWE) que é ausente em outras proteínas (GIJZEM; NURNBERGER, 2006). E podem ser classificadas em tipo I, II ou III dependendo da quantidade de resíduos conservados de cisteínas, possuindo com raras exceções sequência de peptídeo sinal na região N-terminal sinalizando sua secreção, sugerindo função extracelular (GIJZEM; NURNBERGER, 2006; OOME; ACKERVEKEN, 2014).

Dentre os genes que codificam essas proteínas em Mp, o gene 2 possui maior expressão durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa, especialmente no estágio necrotrófico avançado da doença (ZAPAROLI, et al. 2011), no entanto, o conhecimento sobre essas proteínas relacionadas ao patossistema Mp:*T. cacao* ainda é limitado. Neste sentido, buscamos ampliar o conhecimento sobre MpNEPs com ensaios de indução *in vitro* com extrato vegetal de cacau (hospedeiro) e tabaco (não hospedeiro) em micélio saprofítico de

Mp, verificação da diferença na resposta de indução entre os isolados do fungo e ainda a detecção dessas proteínas de necrose em tecido de cacau com diferentes estágios da VB.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do material biológico

Coleta de material vegetal

Ápices caulinares e fruto de *Theobroma cacao* com e sem sintomas aparentes de vassoura-de-bruxa foram coletados na CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) em Ilhéus, Bahia. Esse material foi submetido à extração de proteínas para posterior detecção da presença de MpNEP nas diferentes amostras.



Figura 1. Material biológico de *Theobroma cacao* coletado na CEPLAC (banco de germoplasma). Ramo com sintomas de vassoura verde; ramo com sintomas da vassoura-de-bruxa em transição; fruto com vassoura-de-bruxa (moranguinho); ramo sem sintomas aparentes de vassoura-de-bruxa.

Coleta e indução do micélio fúngico e secretoma

A coleta do micélio saprofítico do *Moniliophthora perniciosa* (biótipos C, S, 4145 e 1441) e o secretoma, foram realizadas após o cultivo em meio líquido mineral contendo (1 %), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (1 %), KCl (0.2 %), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 %), extrato de levedura (0.5 %), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.05 %) e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.001 %) a 25°C (GARCIA et al, 2007).

Para induzir a produção de MpNEP *in vitro*, tecido de ápices caulinares de *Theobroma cacao* e *Nicotiana tabacum* sadios, foram macerados. Cerca de 10 mg do material em pó com 1 mL de tampão fosfato (0,025 mol.L⁻¹, pH 6.0) foi utilizado para preparar o extrato de indução.

Discos de micélio foram isolados de uma placa de Petri e inoculados em 50 mL de meio mineral líquido. O material permaneceu por sete dias em BOD a 28° C. Após este período, o meio líquido foi substituído por 50 mL de meio mineral líquido acrescido de 900 µL do extrato vegetal filtroesterilizado (0,22 µm). O material permaneceu por mais sete dias em BOD. O micélio e o meio de cultura, contendo secretoma, foram então coletados. O secretoma foi filtrado (0,45 µm), de forma a garantir ausência de micélio. Ambos os materiais foram imediatamente congelados e armazenados a -20° C. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

2.2 Extração proteica de ápices caulinares de *Theobroma cacao*

O material vegetal foi coletado de plantas adultas mantidas no banco de germoplasma de *Theobroma cacao* da CEPLAC. Foram coletados materiais vegetais representativo de três diferentes fases da vassoura-de-bruxa: vassoura-verde, vassoura em transição e o fruto “moranguinho” (fruto infectado) além de ramos de cacau sem sintomas de vassoura de bruxa, que foram utilizados como controle. Após a coleta dos ramos e frutos, os mesmos foram levados até o CBG (Centro de Biotecnologia e Genética) onde foram submetidos a liofilização. A extração de proteínas foi realizada utilizando 600 mg do material liofilizado. As condições de extração foram desnaturantes, seguindo o protocolo estabelecido por Pirovani et al. (2008). Após extração proteica, os pellets foram ressuspensos em 800 µL de tampão de reidratação (uréia 7 mol.L⁻¹, tiourea 2 mol.L⁻¹ e CHAPS 2 %) e a concentração das proteínas foi determinada a partir de 2-D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences) de acordo com as recomendações do fabricante.

2.3. Extração proteica de micélio e secretomas do fungo *Moniliophthora perniciosa*

O micélio dos isolados (biótipos C, S, 4145 e 1441) cultivados em meio mineral líquido conforme mencionado no tópico 2.1 foi filtrado e submetido à extração. As condições

de extração foram desnaturantes, de acordo com o protocolo estabelecido por Meyer (1988) e Pirovani (2010) adaptado. Resumidamente, 600 mg das amostras de micélio foram ressuspensas em ácido tricloroacético 10 % em acetona 100 %, sonificadas em um processador ultrassônico (GEX 130 W) para romper as membranas. A sonificação foi realizada com 3 pulsos de 5 s em intervalos de 10 s com amplitude 70 %. As amostras foram mantidas em gelo durante todo o processo. Após a sonificação as amostras foram centrifugadas à 10000 rpm por 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados ressuspensos em ácido tricloroacético 10 % em água. As amostras foram novamente sonificadas e centrifugadas como descrito. Os sobrenadantes foram descartados, os precipitados lavados e ressuspensos três vezes em uma solução gelada de acetona 80 %. Entre as etapas de lavagem as amostras foram mantidas em gelo e centrifugadas como descrito. Os precipitados finais obtidos foram secos ao ar durante 2 h e ressuspensos em 800 µL de tampão de reidratação (uréia 7 mol.L⁻¹, tiourea 2 mol.L⁻¹ e CHAPS 2 %) e armazenados em freezer -20 °C. A concentração proteica foi determinada utilizando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences) de acordo com as recomendações do fabricante.

As proteínas do secretoma foram obtidas de acordo com a metodologia descrita por Alvim (2009). Os secretomas não induzido e induzido, após uma semana de cultivo do fungo, foram coletados de cada isolado e precipitados em 8 mL de ácido tricloroacético a 10 % em água “*over night*” a 4 °C. Seguido a precipitação, as amostras foram centrifugadas à 14000 rpm por 15 min a 4 °C. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e os precipitados lavados. Os precipitados foram lavados três vezes com acetona gelada 80 % e com etanol 70 % duas vezes. Entre essas etapas de lavagens as amostras foram mantidas no gelo e centrifugadas a 14000 rpm por 15 min a 4 °C. Os precipitados obtidos foram secos ao ar durante 2 horas e ressuspensos com 300 µL de reidratação (uréia 7 mol.L⁻¹, tiourea 2 mol.L⁻¹ e CHAPS 2 %) e armazenados em freezer -20 °C. Após extração, a concentração proteica foi determinada utilizando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences) de acordo com as recomendações do fabricante.

2.4 1D-SDS-PAGE e immunoblotting

Para analisar o perfil proteico, foi realizada SDS-PAGE utilizando 60 µg do extrato proteico de cada amostra em mini-gel vertical de poliacrilamida 12,5 % a 30 mA durante 4 h.

Posterior à corrida, o mini-gel foi fixado em tampão (etanol 40 % e ácido acético 10 %) e em seguida as proteínas totais foram visualizadas após coloração com Comassie coloidal (NEUHOFF et al., 1988). Alternativamente as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. A transferência proteica foi bloqueada com solução de leite em pó (2,5 %) em TBS-1x (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.8 % NaCl, 0.1 % Tween 20) e incubada com anticorpo policlonal anti-MpNEP (diluição 1:1000) por 1 h sob agitação. Após lavagens com TBS-1x, o anticorpo anti-coelho marcado com fosfatase alcalina (Sigma, diluição 1: 10 000) foi utilizado como anticorpo secundário. A interação foi revelada na presença de NBT / BCIP (Promega). As bandas imunodetectadas com peso molecular ~24kDa foram quantificadas pelo *software* GelQualNET.

2.5 Purificação de anticorpos por imuno-adsorção ao antígeno recombinante

O anticorpo contra MpNEP foi purificado e com finalidade de otimizar essa detecção, utilizando o protocolo proposto por Sambrook et al (1989) adaptado por Pirovani (1999). Em uma membrana de nitrocelulose 2 x 5 cm (10 cm²) foi aplicado solução de proteína MpNEP2 recombinante conforme a capacidade de adsorção da solução proteica pela membrana, saturando-a com 1 mg de proteína. Posteriormente, a membrana foi bloqueada, incubando por 30 min em solução de leite em pó (2,5 g em 50 mL de TBS-T 1x). Após isto, a membrana foi incubada em soro anti-NEP (1:100) por 1h. Posterior a cada etapa, a membrana foi lavada com TBS-T 1x (3x 15 min cada). Em seguida foi realizada eluição dos IgG's da membrana com 25 mL de glicina 0,05 M, pH 2,9, sendo incubada 30 min sob agitação. Na solução de glicina recuperada, contendo o anticorpo adsorvido e concentrado, foi adicionado 5 mL de TBS 10x. O pH da solução foi ajustado para 7,4 e acrescentado 50 µl de Tween 20.

2.6 Teste de resistência do fungo

Para verificar a resistência a agentes indutores de estresse em parede celular, discos de 5 mm de micélio de *M. perniciosus*, crescido por sete dias na presença ou ausência do extrato de cacau, foram isolados e transferidos para meio mineral acrescido de SDS 1% (Dodecil Sulfato de Sódio). Foram testados dois isolados de Mp (1441 e 4145). O material foi cultivado por 24 h, a 25 °C, no escuro. Após esse período o micélio foi observado e

fotografado em microscópio Olympus CX41 na objetiva 10 x escala 100 x. O experimento foi conduzido com três replicatas.

2.7 Atividade enzimática de peroxidase de guaicol (GPX) do micélio de isolados de *M. pernicioso*

A dosagem da atividade enzimática da peroxidase do guaiacol foi realizada a partir de amostras de micélio de dois isolados de Mp (1441 e 4145) crescidos por sete dias na presença ou ausência de extratos vegetais. Para tanto, a 0,04 g de massa micelial liofilizada foram adicionados 800 µl de tampão fosfato de sódio (0,05 mol.L⁻¹ pH 6,0). O material foi macerado e o sobrenadante transferido para novo microtubo. A atividade enzimática foi mensurada a partir do consumo de guaicol. Para cada tratamento foi utilizado quatro replicatas na dosagem. Para cada repetição dos isolados, foram adicionados 140 µl de mix de atividade (Guaicol 0,04 mol.L⁻¹, H₂O₂ 0,06 %, fosfato de sódio 0,02 mol.L⁻¹, pH 6,0), 130 µl de tampão fosfato de sódio e 10 µl do extrato bruto micelial. A atividade da enzima foi determinada visto que o consumo do guaicol pode ser monitorado via absorbância em comprimento de onda de 470 nm a 25 °C. As leituras foram obtidas em espectrofotômetro Spectramax Paradigm (Molecular Devices, CA, EUA).

3. RESULTADOS

3.1 Perfil proteico de *T. cacao* em diferentes estágios da doença vassoura-de-bruxa e acúmulo de MpNEP

Inicialmente para verificar em qual estágio da vassoura-de-bruxa (VB) é detectado o maior acúmulo de MpNEP, os ramos e fruto de *T. cacao* com e sem sintomas aparentes da doença, foram submetidos a extração de proteínas. A extração apresentou rendimento de 3,99 µg em ramos sem sintomas aparentes, 2,826 µg em ramos com sintomas de Vassoura Verde (VV), 4,002 µg em ramos com sintomas em transição e 1,995 µg em fruto infectado com *M. pernicioso* (moranguinho).

Para visualizar o perfil das proteínas uma massa de 60µg foi resolvida em gel SDS-PAGE. Todos os estágios da VB e amostra sem sintoma apresentaram uma distribuição de bandas com uma variedade de proteínas entre as faixas de peso molecular 14 e 97 kDa. As amostras apresentaram uma distribuição similar das proteínas para as diferentes faixas de peso molecular (Figura 2).

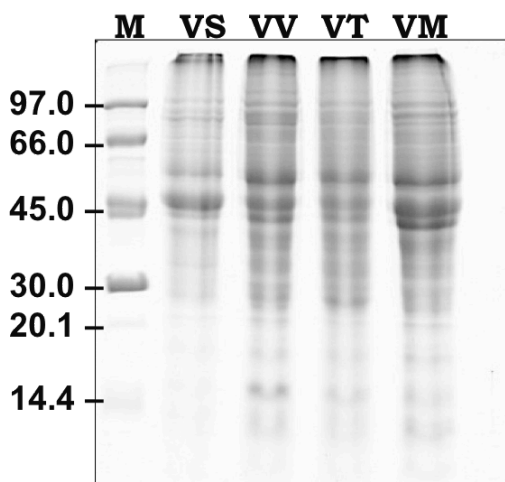


Figura 2. SDS-PAGE com 60 µg de proteína obtida de *T. cacao* de amostras controle ou infectada com Mp. M- marcador de peso molecular em kDa; VS- sem vassoura-de-bruxa; VV- vassoura verde; VT- vassoura em transição; VM- fruto (moranguinho) infectado com *Monilophthora perniciosa*.

As amostras de proteínas obtidas de diferentes estágios foram utilizadas para imunodeteção de MpNEP. A princípio não foi visualizado o acúmulo dessa proteína nas amostras analisadas. A revelação da banda (24-25 kDa) indicando detecção de MpNEP no controle, confirma que todo o procedimento executado da técnica foi adequado (Figura 3).

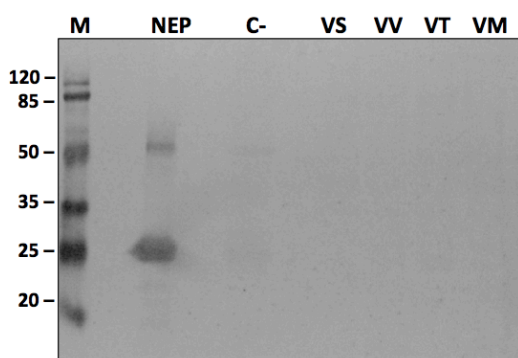


Figura 3. Immunoblotting utilizando o anticorpo policlonal contra MpNEP. Trinta microgramas de proteína total isolada de *T. cacao* foram submetidos a ensaio de imunodeteção. M- marcador de peso molecular (20 a 120kDa) Thermo Fisher Scientific; NEP – MpNEP2 recombinante como controle +; C – controle com proteínas de *Nicotiana tabacum*; VS- proteínas de ramos sem vassoura-de-bruxa; VV- proteínas de ramos com vassoura verde; VT- proteínas de ramos com vassoura em transição; VM- fruto (moranguinho) infectado por Mp.

A não visualização da MpNEP na membrana pode ter sido devido às amostras proteicas serem mais abundantes proteínas do cacau do que de proteínas do patógeno. Além disso, sabe-se que os efetores dos patógeno costumam ser produzidos em pequenas quantidades pelo mesmo. Assim, a concentração e purificação do anticorpo contra MpNEP por imuno-adsorção foi realizada com finalidade de otimizar os resultados do *imunoblotting*.

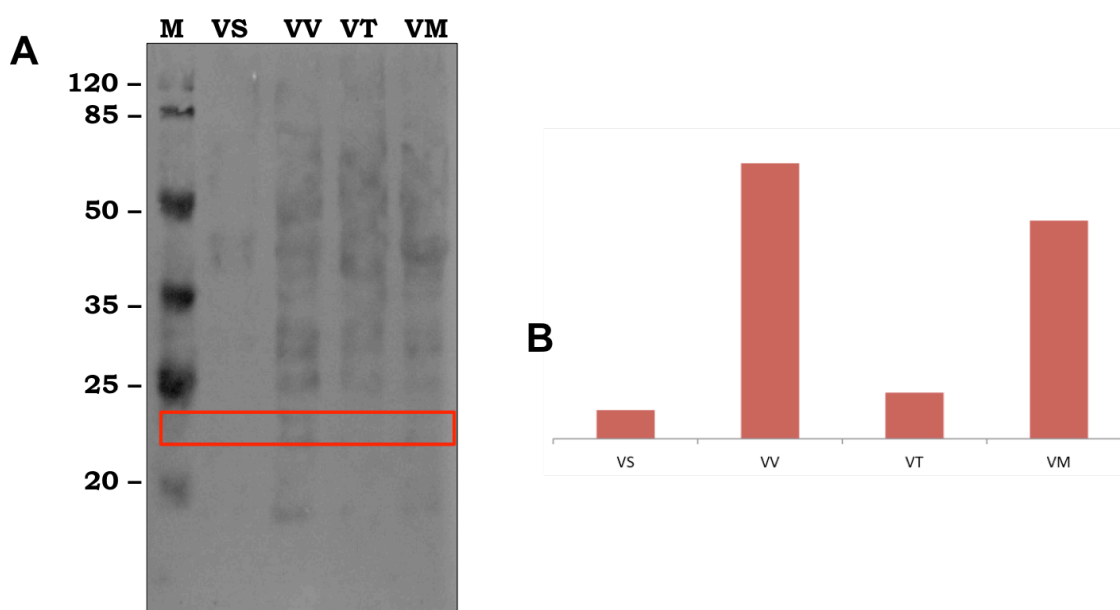


Figura 4. Immunoblotting utilizando o anticorpo policlonal, purificado por imunoadsorção contra a rMpNEP. Trinta microgramas de proteína total isolada de *T. cacao* foram submetidos a ensaio de imunodeteção. A: **M**- marcador de peso molecular (20 a 120 kDa) Thermo Fisher Scientific; **VS**- proteínas de ramos sem vassoura-de-bruxa; **VV**- proteínas de ramos com vassoura verde; **VT**- proteínas de ramos com vassoura em transição; **VM**- fruto (moranguinho) infectado por Mp. Em vermelho destaque de bandas com peso molecular de 24kDa. B: Quantificação das bandas de 24kDa pelo *software* GelQuantNET.

Após a purificação e concentração do anticorpo, bandas de tamanho variado foram detectadas nas membranas de nitrocelulose. Contudo, dentre essas foi possível observar a presença de proteínas de ~24 kDa, tamanho esperado para MpNEP. Essas bandas foram imunodetectadas em todas as amostras testadas. Contudo, a intensidade da banda foi maior em amostras de tecido da vassoura verde (VV) e do fruto “moranguinho”, o que sugere ser esses os estágios de maior acúmulo de proteínas MpNEP (Figura 4A,B).

3.2 Perfil proteico de micélio e secretoma de *M. perniciosa* induzido ou não com extrato de hospedeiro e não hospedeiro

Para observar se a expressão de proteínas MpNEP é induzida com extrato vegetal do hospedeiro no micélio saprofítico *in vitro*, foi realizado um ensaio cultivando dois isolados de fungo Mp biótipo C e biótipo S em meio mineral acrescido ou não com extrato vegetal do cacau. Após o crescimento do fungo, os extratos proteicos do micélio foram obtidas em concentrações de 3,067 µg/µl de micélio biótipo C induzido com extrato de *T. cacao* (MCI), 4,687 µg/µl de micélio biótipo C não induzido (MCN), 1,624 µg/µl micélio biótipo S induzido com extrato de *T. cacao* (MSI) e 3,523 µg/µl de micélio biótipo S não induzido com extrato de *T. cacao* (MSN). O rendimento proteico dessas amostras foi ajustado para 40 µg e visualizado em gel SDS-PAGE (Figura 5).

Proteínas de secretoma também foram recuperadas posteriormente ao cultivo do fungo, apresentando concentrações de 1,619 µg/µl para secretoma do biótipo S acrescido com extrato de *T. cacao* (SSI), 0,76 µg/µl de biótipo S com ausência do extrato da planta (SSN), 1,017 µg/µl de secretoma com biótipo C acrescido com extrato de *T. cacao* (SCI) e 0,696 µg/µl de secretoma com biótipo C em ausência do extrato da planta (SCN). Para essas amostras de secretoma, ± 20 µg de cada amostra obtida foi aplicado em gel SDS-PAGE para visualizar a qualidade das proteínas isoladas dos secretomas (Figura 5).

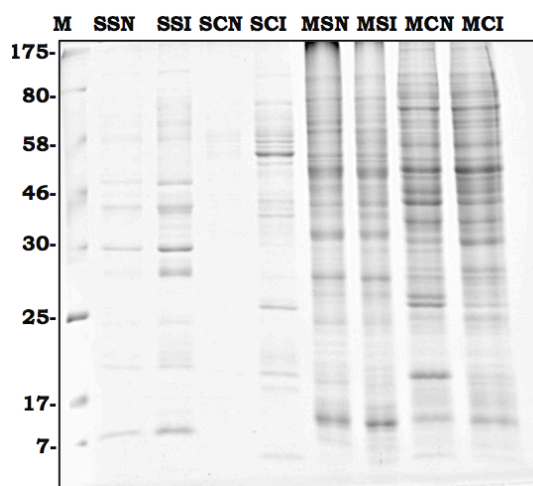


Figura 5. Proteínas isoladas de micélio saprofítico e secretoma de dois isolados de *M. perniciosa* (biótipo S e C). As amostras foram resolvidas em SDS PAGE e visualizadas após coloração com azul de comassie. O fungo foi cultivado na presença ou não do extrato de *T. cacao*. **M** - marcador de peso molecular (7 a 175kDa) GE Healthcare; **SSN** - secretoma de Mp (biótipo S) não induzido; **SSI** secretoma de Mp (biótipo S) induzido; **SCN** - secretoma de Mp não induzido (biotipo C); **MSN** - Mp Micélio de Mp (biótipo S) não induzido; **MSI** - Mp Micélio de Mp (biótipo S) induzido; **MCN** - Micélio de Mp (biótipo C) não induzido; **MCI** - Micélio de Mp (biótipo C) induzido.

A mesma concentração de proteínas (demonstrado em gel no material suplementar 1) das amostras de micélio saprofítico foi transferida para membrana de nitrocelulose para imunodeteção de MpNEP. Bandas com peso molecular de MpNEP são mostradas em maior intensidade nos tratamentos acrescidos com extrato de *T. cacao*, em ambos biótipos contrastados (Figura 6A,B).

A revelação de bandas com peso molecular menor que ~24 kDa ocorreu em amostras dos secretomas induzidos em ambos biótipos (Figura 6A,B).

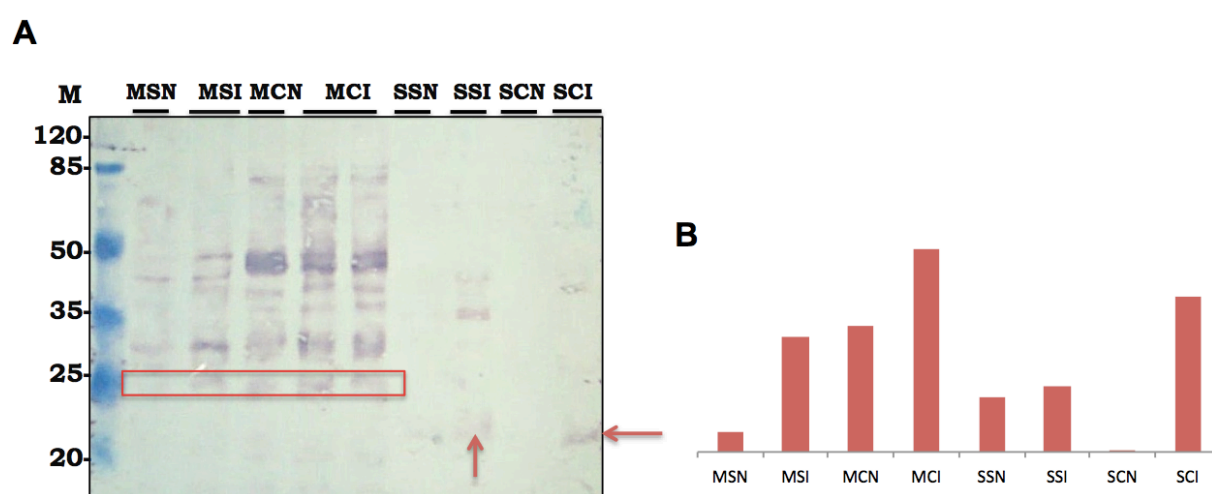


Figura 6. Imunodeteção de MpNEP em secretomas e micélios de dois isolados de *M. perniciosa* induzido e não induzido com extrato de *T. cacao*. A: M – marcador de peso molecular (20-120kDa) Thermo Fisher Scientific; MSN – micélio biotrófico do biótipo S não induzido; MSI – micélio biotrófico do biótipo S induzido; MCN – micélio biotrófico do biótipo C não induzido; MCI – micélio biotrófico do biótipo C induzido; SSN – secretoma do fungo biótipo S não induzido; SSI – secretoma do fungo biótipo S induzido; SCN – secretoma do fungo biótipo C não induzido. Em vermelho destaque de bandas com peso molecular de 24kDa. B: Quantificação das bandas de 24kDa pelo software GelQuantNET.

Para detectar se o extrato da planta não hospedeira (*Nicotiana tabacum*) também pode induzir o acúmulo de MpNEP em micélios saprofíticos, dois isolados de Mp reportados como agressivos para o cacau (1441 e 4145) foram cultivados em meio mineral com presença ou ausência de extrato vegetal não hospedeira (*Nicotiana tabacum* ou *T. cacao*). As concentrações de proteínas para o isolado 1441 foram de 3,932 µg/µl em condição controle (MC), 1,740 µg/µl em amostra induzida com extrato de cacau (MIC) e 3,293 µg/µl em amostra induzida com extrato de tabaco (MIT). Uma massa de 40 µg foi resolvida em gel SDS-PAGE (Figura 7B).

As concentrações de proteínas isoladas de micélio (4145) foram de 2,612 µg/µl em condição controle (MC), 2,735 µg/µl em amostra obtida na presença de extrato de tabaco

(MIT), 2,186 µg/µl em amostra induzida por extrato de cacau (MIC). Uma massa de 40 µg foi utilizada para visualização em gel SDS-PAGE. Os valores obtidos das concentrações proteicas do secretoma foram ajustados para 30 µg (Figura 7A).

Ambos isolados e tratamentos mostraram distribuição de bandas entre as faixas de 14.4-97 kDa (Figura 7AB).

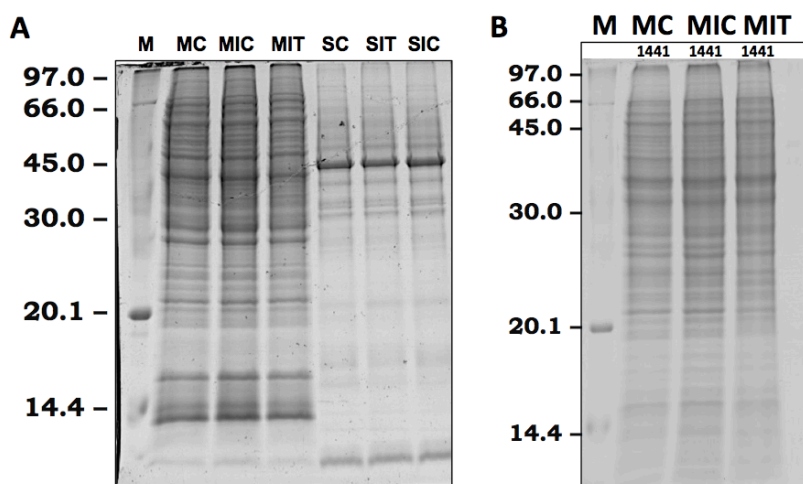


Figura 7. Proteínas isoladas de micélio de Mp (1441 e 4145) e secretoma do isolado 4145 de Mp resolvida em SDS PAGE. As amostras foram visualizada após coloração com azul de comassie. O fungo foi cultivado na presença ou não de extrato bruto de *T. cacao* ou *N. tabacum*. **M** - marcador de peso molecular (14.4-97 kDa) GE Healthcare. Isolado 4145 (**A**): **MC** – proteínas de micélio saprofítico controle; **MIC** – proteínas de micélio saprofítico em presença de extrato de cacau; **MIT** – proteínas de micélio saprofítico em presença do extrato de tabaco; **SC** – proteínas de secretoma controle ; **SIT** – proteínas de secretoma em presença de extrato de cacau; **SIC** – proteínas de secretoma em presença de extrato de cacau. Isolado 1441 (**B**): **MC** – proteínas de micélio saprofítico controle; **MIC** – proteínas de micélio saprofítico em presença de extrato de cacau; **MIT** – proteínas de micélio saprofítico em presença do extrato de tabaco.

A mesma quantidade de proteína (Figura 7) dos tratamentos supracitados foi transferida para membrana de nitrocelulose para realizar imunodeteção de MpNEP.

No resultado da imunodeteção para este ensaio foi visualizado o acúmulo de maior intensidade para bandas em faixa de ~24k Da para as amostras de micélio, esperada para a MpNEP, sendo observado a partir da membrana (Figura 8A) e do gráfico (Figura 8B) uma intensidade diferencial entre os tratamentos.

Para proteínas de secretomas acrescidos ou não com extrato vegetal, ocorreu o acúmulo de bandas com massa molecular inferior a ~24k Da, com maior intensidade em tratamento com presença do extrato de cacau (Figura 8A,B).

A imunodeteção realizada em extrato de micélio 1441 revelou bandas de peso molecular de ~24k Da e com maior intensidade abaixo da faixa do que é esperado para a MpNEP (Figura 9A,B), assim como no secretoma do isolado 4145.

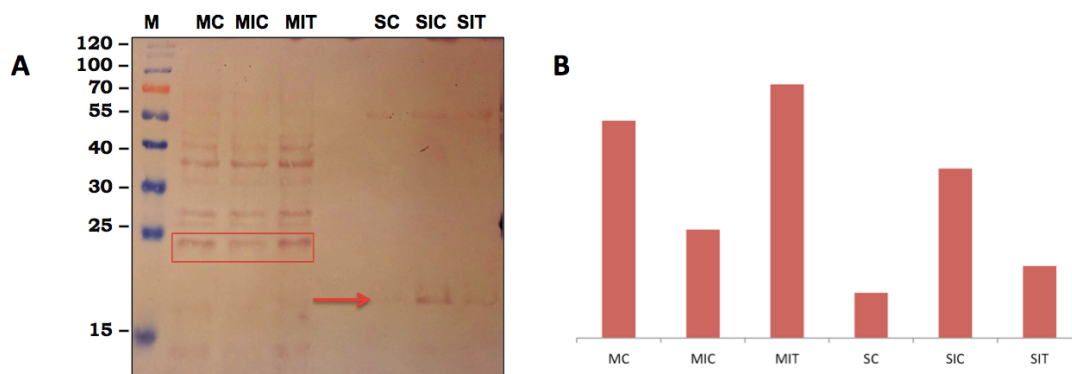


Figura 8. Imunodeteção de MpNEP em micélio e secretoma de Mp (isolado 4145), induzido ou não induzido com extrato de *T. cacao* e *N. tabacum*. O isolado 4145 foi cultivado na presença e ausência do extrato de cacau e tabaco. A: **M** – marcador de peso molecular (15-170 kDa) ThermoFisher Scientific; **MC** – proteínas de micélio saprofítico controle; **MIC** – proteínas de micélio saprofítico em presença de extrato de cacau; **MIT** – proteínas de micélio saprofítico em presença do extrato de tabaco; **SC** – proteínas de secretoma controle ; **SIC** – proteínas de secretoma em presença de extrato de cacau; **SIT** – proteínas de secretoma em presença de extrato de tabaco. Em vermelho destaque de bandas com peso molecular de 24 kDa. B: Quantificação das bandas de 24kDa pelo *software* GelQuantNET.

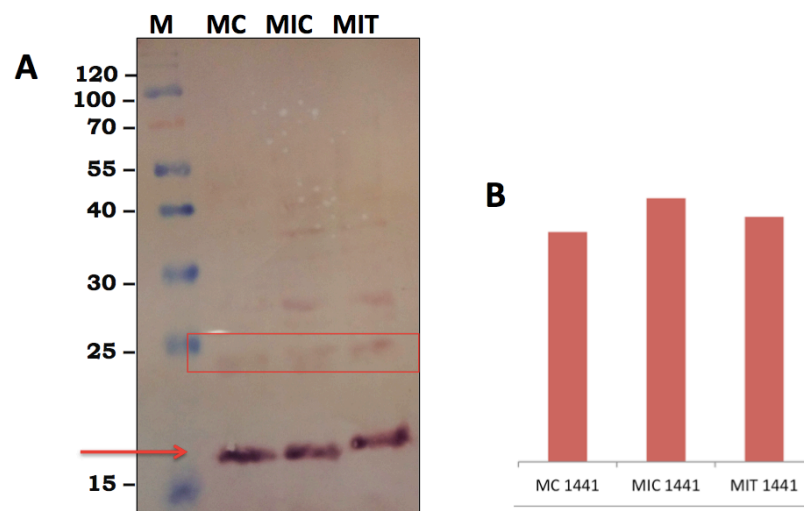


Figura 9. Imunodeteção de MpNEP em micélio de Mp (isolado 1441), induzido e não induzido com extrato de *T. cacao* e *N. tabacum*. O isolado 1441 foi cultivado na presença ou ausência do extrato de cacau e tabaco. A: **M** – marcador de peso molecular (15-170 kDa) ThermoFisher Scientific; **MC** – proteínas de micélio saprofítico controle; **MIC** – proteínas de micélio saprofítico em presença de extrato de cacau; **MIT** – proteínas de micélio saprofítico em presença do extrato de tabaco. Em vermelho destaque de bandas com peso molecular de 24kDa. B: Quantificação das bandas de 24 kDa pelo *software* GelQuantNET.

3.3 Análise de resistência ao estresse de parede celular do fungo *Moniliophthora perniciosa*

Para verificar se o extrato de planta hospedeira ou não hospedeira induz mudanças na parede celular (PC) do fungo Mp, foi testada a resistência da PC via crescimento micelial em

meio de cultura contendo o estressador de parede SDS (Dodecil Sulfato de Sódio). Nesse ensaio, dois isolados do Mp, 1441 e 4145, foram cultivados por sete dias na presença ou ausência de *T. cacao* ou *N. tabacum*. Posteriormente, discos miceliais foram transferidos desta cultura para meio mineral sólido acrescido de 1% de SDS. O crescimento sem a presença de SDS foi utilizado como controle.

Foi observado que em condições não estressantes, o micélio do isolado 1441 cresce mais rapidamente do que o 4145. Além disso, a taxa de crescimento de ambos isolados não foi afetada pela presença de extratos vegetais (Figura 10, 2). Contudo, na presença de SDS, observou-se que o isolado 4145 manteve o crescimento, apesar de apresentar uma taxa menor do que o observado para o mesmo micélio mantido em meio sem SDS. Mais além, observou-se também que quando elicitado com extrato de cacau, o micélio do isolado 4145 apresentou uma taxa de crescimento na presença de SDS maior do que a observada nos demais tratamentos. Esses resultados sugerem que algum (ns) componente (s) contido apenas ou em maior quantidade no extrato de cacau induz (em) mudanças na estrutura da PC de Mp tornando-a mais resistente.

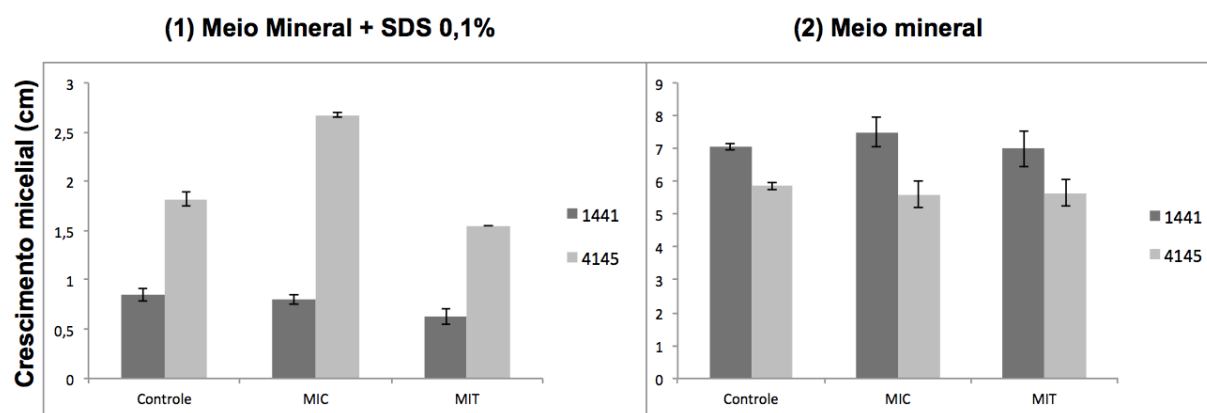


Figura 10. Análise de resistência ao estresse da parede celular de Mp. Avaliação do crescimento micelial cinco dias após a inoculação de duas variedades de Mp previamente induzidas com extrato bruto de *Theobroma cacao* (MIC), *Nicotiana tabacum* (MIT) e não induzidas (controle) em: (1) meio contendo dietil sulfato de sódio (SDS, 0,1%); como controle o crescimento em (2) meio mineral.

A análise microscópica do material revelou que as hifas do isolado 4145 crescidas na presença de extratos vegetais se tornaram mais aglomeradas e densas em comparação com as hifas crescidas em meio controle (Figura 11).

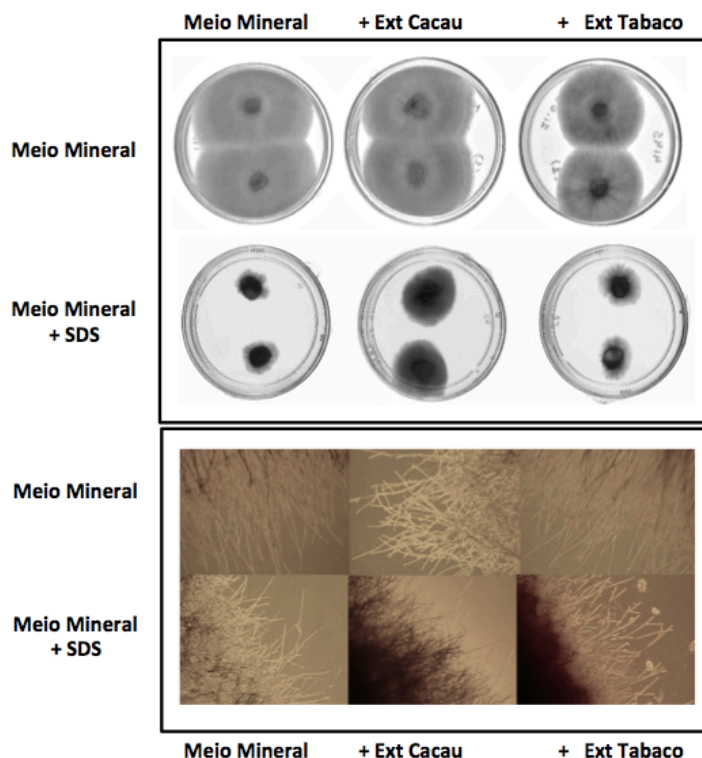


Figura 11. Análise de resistência ao estresse da parede celular de Mp. Avaliação do crescimento micelial cinco dias após a inoculação do isolado 4145 de Mp em meio mineral contendo SDS 0,1% e em condição controle de meio mineral sem SDS 0,1 previamente induzidas com extrato bruto de *Theobroma cacao*, *Nicotiana tabacum* e sem indução. Observação do crescimento micelial em placa de Petri e micrografia de micélio ao microscópio Olympus CX41 (10x escala 100x).

3.4 Atividade da enzima peroxidase do guaicol (GPX)

Para verificar a resposta enzimática do micélio de *M. perniciosa* em variedades 1441 e 4145 induzido ou não com extrato de planta hospedeira ou não hospedeira, foi realizado a determinação da atividade enzimática da peroxidase do guaicol (GPX). O resultado da determinação mostrou que não houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre controle e os tratamentos nas duas variedades analisadas (Figura 12). No entanto, a atividade de GPX aumentou duas vezes em micélio de ambos isolados induzidos com extrato de *N. tabacum* e um terço em micélios induzidos com extrato de *T. cacao* (Figura 12).

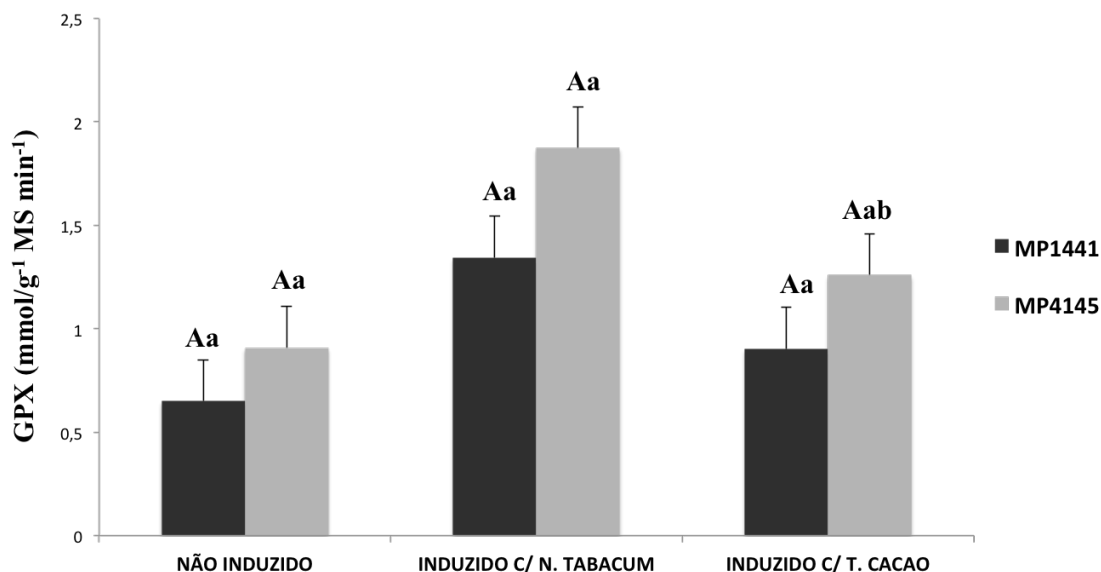


Figura 12. Teste de Atividade da Peroxidase de Guaiacol (GPX) de micélios não induzidos, induzido com extrato *N. tabacum* ou *T. cacao* de duas variedades de Mp (1441 e 4145). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas e ou minúsculas não diferem entre si, dentro e entre variedades, respectivamente, pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As barras correspondem aos erros padrões das médias.

4. DISCUSSÃO

4.1 Eficiência da extração de proteínas de *T. cacao* em diferentes estágios da doença vassoura-de-bruxa e imunodeteção de MpNEP2

O método de extração de Pirovani et al., 2008, com devidas modificações para cada tipo de material utilizado, se mostrou eficiente para obtenção de proteínas de tecidos do cacau infectados ou não com vassoura-de-bruxa, não sendo visualizado arraste em gel, o que dificultaria a visualização do perfil proteico das amostras analisadas.

O estágio biotrófico de *M. perniciosa* em *T. cacao* é caracterizado pelo desenvolvimento lento de hifas nos espaços intercelulares, sendo encontradas em densidades muito baixas nos tecidos infectados, mesmo assim suficiente para desencadear drásticas alterações fisiológicas e morfológicas na planta (PURDY; SCHMIDT, 1996; MEINHARDT et al., 2008). A não detecção inicialmente de MpNEPs em membrana com amostras de tecidos de cacau infectado por *M. perniciosa* (Figura 3), pode ser explicada pela quantidade mínima do fungo e seus efetores. Assim, a purificação e concentração do anticorpo, por imunoadsorção, permitiu a otimização do resultado ocorrendo a revelação de bandas em

faixas ~24 kDa que pode indicar o acúmulo de MpNEP com maior intensidade na vassoura verde (Figura 4).

Até o momento, as MpNEPs em tecidos de cacau em diferentes estágios de desenvolvimento da vassoura-de-bruxa só haviam sido analisadas visando o acúmulo de transcrito (GARCIA et al., 2007; ZAPAROLI, et al., 2011). Portanto este é o primeiro estudo que buscou visualizar e detectar proteínas MpNEPs nos diferentes estágios da VB.

4.2 Indução de MpNEP *in vitro* de *M. pernicioso* a partir de extrato de planta hospedeira (cacau) e não hospedeira (tabaco)

Os métodos de extração propostos por Meyer (1988); Pirovani (2010) e Alvim (2009) foram eficientes para isolar proteínas de micélio saprofítico e secretoma (biótipos C e S) após o cultivo na presença e ausência de extrato de cacau. Os géis obtidos apresentaram rendimento proteico suficiente para prosseguir em etapas posteriores de imunodeteção (Figura 5). Vale salientar que *M. pernicioso* além do *Theobroma cacao* possui outras espécies e gêneros hospedeiros, o que nomeia em diferentes biótipos. Por exemplo, os biótipos C são para *M. pernicioso* que infecta espécies de *Theobroma* e *Herrania*, já os biótipos S infectam membros da família Solonaceae (como o tomate) (BASTOS; EVANS, 1985; HEDGER; PICKERING; ARAGUNDI, 1987; RESENDE et al., 2000; GRIFFITH et al., 2003). A utilização desses diferentes biótipos para o ensaio possibilitou verificar se o extrato de *Theobroma cacao* induz MpNEP em ambos os isolados, tanto o biótipo C quanto o S produziram maior acúmulo de proteínas com peso molecular de MpNEPs, observando que não há diferença de indução para esses biótipos estudados.

O acúmulo de bandas na faixa ~24 kDa, correspondente a MpNEP, foram imunodetectadas em micélio saprofítico, com maior intensidade quando acrescidos com extrato vegetal hospedeiro, tanto biótipo S quanto o C (Figura 6). Para proteínas do secretoma ocorreu o acúmulo de bandas com peso molecular inferior a ~24k Da, em maior intensidade na presença de extrato de cacau (Figura 6). Sugerimos que essas bandas podem corresponder a MpNEPs que após a secreção sofre alguma modificação, no entanto não há relatos sobre essa associação.

Trabalhos de cultivos do patógeno *in vitro* na presença de extrato do hospedeiro a fim de induzir proteínas secretoras associadas à patogênese, podem fornecer informações

significativas sobre a dinâmica de interação patógeno-hospedeiro. Como o estudo realizado por Barnabas et al. (2016) de proteômica do secretoma após o crescimento *in vitro* do patógeno *Sporisorium scitamineum* na presença do extrato hospedeiro (meristema de cana-de-açúcar), identificando proteínas que possivelmente estão relacionadas com a patogenicidade do fungo.

Outra abordagem neste sentido, foi explorando se tanto o extrato da planta hospedeira quanto não hospedeira pode induzir respostas no patógeno. Desse modo, o cultivo do micélio saprofítico de dois isolados (1441 e 4145) ocorreu na presença de *Nicotiana tabacum* ou *T. cacao* ou na ausência de ambos. O resultado da imunodeteção revelou bandas com peso molecular de ~24 kDa, sugerindo MpNEPs, para as amostras de micélio 4145, com maior intensidade na presença de extrato de não hospedeiro (Figura 8). No entanto, o secretoma apresentou bandas em faixa inferior a ~24k Da com maior intensidade quando na presença de extrato hospedeiro.

Bandas na faixa de ~24 kDa também foram reveladas para micélio saprofítico do isolado 1441, adicionalmente bandas abaixo do que é esperado para MpNEP também foram reveladas, com maior intensidade (Figura 9).

Pesquisas com secretomas *in planta* também tem sido utilizadas para investigar mecanismos de fitopatógenos. Por exemplo, o estudo do secretoma de *M. perniciosa* após o cultivo em meio com diferentes fontes de carbono foi infiltrado em folhas de *N. tabacum* e verificou-se visto que todos os tratamentos foram capazes de induzir morte celular, demonstrando que as proteínas de patogenicidade secretadas estão associadas às fontes de carbono sendo esta uma via sinalizadora (ALVIM et al., 2009). A infiltração dos secretomas em folhas de tabaco é uma abordagem interessante e subsidia resultados esperados neste estudo, uma vez que MpNEP possui atividade necrotrófica, ao unir dados de *western blot* das diferentes induções com resultados de infiltração, proporcionaria a confirmação da indução *in vitro* dessa proteína.

SDS é um desestabilizador de parede, o que se torna um fator de estresse sobre a célula fúngica, dificultando o seu crescimento. Na presença de SDS 1% e em resposta ao extrato vegetal, os isolados modificaram o padrão de crescimento, apresentando maior crescimento radial o isolado 4145 comparado ao 1441 (Figura 10). Os controles apresentam o mesmo padrão de crescimento (Figura 10). Ademais, o isolado 4145 demonstrou crescimento micelial mais aglomerado e mais vigoroso, comparado aos controles (Figura 11). O

crecimento desse material em meio contendo SDS sugere que os extratos vegetais podem induzir mudanças na composição ou no arranjo do componentes de parede celular (PC).

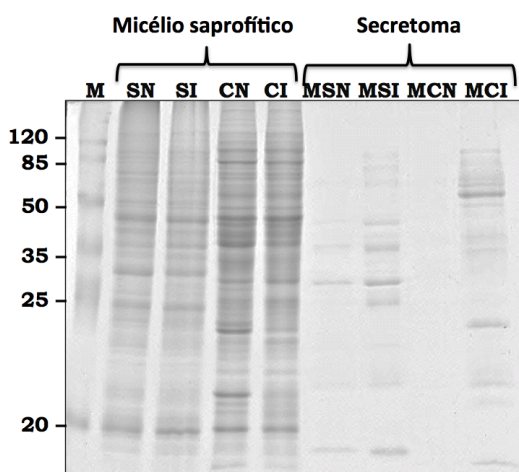
Em resposta enzimática GPX a atividade entre os isolados não apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) (Figura 12). No entanto, a atividade enzimática aumentou em resposta a presença dos extratos. Os isolados 1441 e 4145 aumentaram duas vezes a atividade de GPX em amostras induzidas com extrato não hospedeiro. Além disso, ambos isolados elevaram um terço da atividade em relação ao controle em amostras induzidos com extrato hospedeiro. O aumento dessa enzima está diretamente associada com a tolerância ao estresse.

As plantas em condições de estresse estimulado por patógeno, produzem espécies reativas de oxigênio como mecanismo de proteção, que pode ser tóxica para própria planta ou para o patógeno durante a infecção. Para combater essa explosão oxidativa, enzimas como peroxidase de guaicol (GPX) são produzidas promovendo degradação de H_2O_2 em H_2O , melhorando o ambiente para sobrevivência. Portanto uma maior produção dessas enzimas antioxidantes, confere a maior tolerância ao estresse (MITTLER, 2002; MUNNÉ-BOSCH 2013).

5. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu observar o maior acúmulo de proteínas MpNEP em estágio de vassoura verde. Além disso, a produção de MpNEP *in vitro* pode ser induzida a partir de extrato vegetal hospedeiro e não hospedeiro, concomitantemente induzindo modificações no micélio e aumento na resposta de defesa do fungo.

Material suplementar 1: SDS-PAGE espelho do *western blot* da Figura 5.



6. REFERÊNCIAS

ALVIM, F.C. et al. Carbon source-induced changes in the physiology of the cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* (Basidiomycetes) affect mycelial morphology and secretion of necrosis-inducing proteins. **Genetics and Molecular Research**. 3, 1035-1050, 2009

ALVIM, F.C. **Análise da influência da fonte de carbono na patogenicidade do *Moniliophthora perniciosa* em *Theobroma cacao***. Universidade Estadual de Campinas. Tese de Doutorado. 118p Campinas, 2009.

BARNABAS, L. et al. Proteomic analysis of a compatible interaction between sugarcane and *Sporisorium scitamineum*. **Proteomics**. 16, 1111–1122, 2016.

BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology**. 34, 306–312, 1985.

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

GARCIA, O. et al. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. **Mycological Research** 111, 443–455, 2007.

GIJZEN, M.; NURNBERGER, T. Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. **Phytochemistry**. 67, 1800-18007, 2006.

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

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

HOLLIDAY, P. **Fungus Diseases of Tropical Crops**. New York: Dover Pub. Inc. 1980

KILARU, A; HASENSTEIN, K. H. Development and pathogenicity of the fungus *Crinipellis*

perniciosa on interaction with cacao leaves. **Phytopathology**. 95, 101-107, 2005.

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

MEYER Y et al. Preparation by two- dimensional electrophoresis of proteins for antibody production: antibodies against proteins whose synthesis is reduced by auxin in tobacco mesophyll protoplasts. **Electrophoresis**. 9, 704–12, 1988.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MUNNÉ-BOSCH, S. et al. The Impact of Global Change Factors on Redox Signaling Underpinning Stress Tolerance. **Plant Physiology**. 161, 5-19, 2013.

NEUHOFF, V et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**. 9, 255–262, 1988.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. **Identificação e manejo das principais doenças do cacauzeiro no Brasil**. In Ciência e Tecnologia do Cacauzeiro. Editor, R.R. Valle. Gráfica e Editora Vital Ltda. 123-151, 2007.

OOME, S.; ACKERVEKEN, G. V. Comparative and Functional Analysis of the Widely Occurring Family of Nep1-Like Proteins. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 27, 1081–1094, 2014.

PIROVANI, C. P. et al. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. **Electrophoresis**. 29, 2391–2401, 2008.

PIROVANI, C. P. et al. *Theobroma cacao* cystatins impair *Moniliophthora perniciosa* mycelial growth and are involved in postponing cell death symptoms. **Planta** 232, 1485–1497, 2010.

PIROVANI, Carlos Priminho. Caracterização bioquímica da proteína S-64, envolvida no transporte de sacarose em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). 1999. 62 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1999.

PURDY L. H.; SCHMIDT R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology and management. **Annual Review of Phytopathology**. 34, 573– 594, 1996.

RESENDE, M.L.V. et al. *Crinipellis perniciosa* proveniente de um novo hospedeiro, *Heteropterys acutifolia*, é patogênico a *T. cacao*. **Fitopatologia Brasileira**. 25, 88–91, 2000.

RUSCONI, M.; CONTI, A. *Theobroma cacao* L., the Food of the Gods: a scientific approach beyond myths and claims. **Pharmacological research**. 61, 5–13, 2010.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, E. F. T. **Molecular cloning – a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SENA, K. F.; ALEMANNO, L.; GRAMACHO, K. P. The infection process of *Moniliophthora perniciosa* in cacao. **Plant Pathology**. 63, 1272-1281, 2014.

TEIXEIRA, P. J. P. L.; THOMAZELLA, D. P. D T., PEREIRA, G. A. G. Time for Chocolate: Current Understanding and New Perspectives on Cacao Witches' Broom Disease Research. **PLOS Pathology**. 11, 10, 2015.

ZAPAROLI, G. et al. The crystal structure of Necrosis- and Ethylene-Inducing Protein 2 from the causal agent of cacao's witches' broom disease reveals key elements for its activity. **Biochemistry**. 50, 9901–9910, 2011.