

**GUSTAVO HENRIQUE ALCALÁ ZAPAROLI**

**“CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DE  
DUAS CLASSES DE PROTEÍNAS INDUTORAS DE NECROSE  
(CPs E NLPs), PRESENTES EM FUNGOS DO GÊNERO  
*MONILIOPTHORA PERNICIOSA*, PATOGÊNICOS DE  
CACAU”**

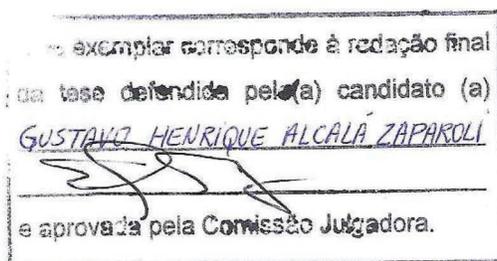
**CAMPINAS  
2012**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**GUSTAVO HENRIQUE ALCALÁ ZAPAROLI**

**“CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DE DUAS  
CLASSES DE PROTEÍNAS INDUTORAS DE NECROSE (CPs E  
NLPs), PRESENTES EM FUNGOS DO GÊNERO  
MONILIOPHTHORA PERNICIOSA, PATOGÊNICOS DE  
CACAU”**



Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Doutor em Genética e Biologia  
Molecular, na área de Genética de  
Microorganismos.

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira  
Coorientadora: Profa. Dra. Odalys Garcia Cabrera

CAMPINAS,  
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Z17c	<p>Zaparoli, Gustavo Henrique Alcalá, 1983- Caracterização dos mecanismos de ação de duas classes de proteínas indutoras de necrose (CPs e NLPs), presentes em fungos do gênero <i>Moniliophthora</i>, patogênicos do cacau / Gustavo Henrique Alcalá Zaparoli. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira. Coorientador: Odalys Garcia Cabrera. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Moniliophthora perniciosa</i>. 2. Proteínas semelhantes a NEP. 3. Ceratoplataninas. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães, 1964-. II. Cabrera, Odalys Garcia. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
------	---

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Characterization of the mechanisms of action of two classes of necrosis-inducing proteins (CPs and NLPs) present in *Moniliophthora* genus of fungi, pathogenic to cocoa

**Palavras-chave em Inglês:**

*Moniliophthora perniciosa*

NEP-like proteins

Ceratoplatin

**Área de concentração:** Genética de Microorganismos

**Titulação:** Doutor em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira [Orientador]

Alessandro Farias

Victor Genu Faria

Victor Vitorello

Ana Carolina Migliorini Figueira

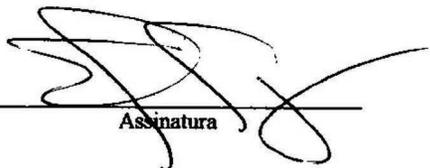
**Data da defesa:** 01-08-2012

**Programa de Pós Graduação:** Genética e Biologia Molecular

Campinas, 31 de julho de 2012.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Assinatura

Prof. Dr. Victor Genu Faria



Assinatura

Prof. Dr. Victor Alexandre Vitorello



Assinatura

Profa. Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira



Assinatura

Prof. Dr. Marcos Antonio Oliveira

Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg

Assinatura

Prof. Dr. Alessandro Farias



Assinatura

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a FAPESP pelo fomento ao trabalho, ao meu orientador Gonçalo e à minha co-orientadora Odalys.

Agradeço a todos os colegas do LGE, em especial meu aluno Patrick, que me auxiliaram de alguma forma nesse trabalho ou no meu caminho até aqui. Ao Joan e Gleidson em especial pela manutenção da casa de vegetação.

Agradeço a Roberta e meus pais pelo apoio e compreensão.

Agradeço a todos os chocólatras do mundo, pois sem eles esta tese e nosso projeto não teria o menor sentido.

# Sumário

<b>Abreviaturas</b>	<b>06</b>
<b>Resumo</b>	<b>07</b>
<b>Introdução</b>	<b>08</b>
<i>Theobroma cacao</i>	08
Doenças do cacau	12
Vassoura-de-Bruca	14
Projeto genoma Vassoura-de-Bruca	16
Monilíase	19
Interação planta-patógeno	21
NLPs	29
Ceratoplataninas	34
<b>Capítulo I – NLPs de <i>M. pernicioso</i> e <i>M. roleri</i></b>	<b>38</b>
Análise de toxicidade de MpNEP2 em células de cacau	38
Artigo (Zaparoli et al., 2011)	41
“Supporting File” referente ao artigo	51
Utilização de MpNEP2 em composição de herbicidas com seletividade a plantas dicotiledôneas	
(Pedido de Patente)	55
<i>M. roleri</i>	57
<b>Capítulo II – Ceratoplataninas de <i>M. pernicioso</i> e <i>M. roleri</i></b>	<b>60</b>
Materiais e Método	60
Resultados e Discussão	64
Análise de sequências	64
Clonagem e expressão das MpCPs de <i>M. pernicioso</i>	65
Clonagem e expressão de MrCPs de <i>M. roleri</i>	67
Testes de atividade	68
Análise de toxicidade das proteínas em células de cacau em cultura	69
Análises de expressão das CPs em <i>Moniliophthora pernicioso</i>	70
Análises de expressão das CPs em <i>Moniliophthora roleri</i>	74
Expressão de genes de defesa em plantas após contato com as CPs	76
Análises estruturais das MpCPs	80
<b>Capítulo III – Discussão final e Modelo</b>	<b>86</b>
<b>Referências</b>	<b>89</b>

## ABREVIATURAS

CNPEM - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

CPs - Ceratoplataninas

DLS - Dynamic Light Scattering ou Espalhamento de Luz Dinâmico

ESTs - Expressed Sequence Tags ou Marcador de Sequencia Genética

ETI - Effector-Triggered Immunity ou Imunidade Desencadeada por Efetor

FDA - Fluorescein Diacetate - corante

HR - Hypersensitive Response ou Resposta Hipersensitiva

LGE - Laboratório de Genômica e Expressão - UNICAMP

LNBio - Laboratório Nacional de Biologia

MAMPs - Microbe-Associated Molecular Patterns ou Padrões Moleculares  
Associados a Micróbios

NEP1 - Necrosis and Ethylene inducing Protein 1

NLPs - NEP1-like Proteins

PAMPs - Pathogen-Associated Molecular Patterns ou Padrões Moleculares  
Associados a Patógenos

PCD - Programmed Cell Death ou Morte Celular Programada

PDB - Protein Databank Base ou Banco de Dados de Proteínas

PRs - Pathogen Related proteins ou proteínas relacionadas à patogenicidade

PTI - PAMP-Triggered Immunity ou Imunidade Desencadeada por PAMP

ROS - Reactive Oxygen Species ou Espécies Reativas de Oxigênio

SAR - Systemic Acquired Resistance ou Resistencia Sistematica Adquirida

SPCL - Sustainable Perennial Crops Lab ou Laboratório de Plantas Perenes

USDA - United States Department of Agriculture ou Departamento de Agricultura  
dos EUA

## Resumo

*Moniliophthora perniciosa* e *Moniliophthora roreri* são dois fungos basidiomicetos hemibiotróficos que causam as doenças Vassoura-de-Bruxa e Monilíase, respectivamente, em cacauzeiros da América Central e do Sul. *M. perniciosa* ataca meristemas de ramos e frutos em desenvolvimento enquanto *M. roreri* é capaz de infectar unicamente os frutos, sendo ambas as doenças devastadoras nas plantações afetadas. Nos genomas de *M. perniciosa* e *M. roreri* foram encontrados genes que codificam pequenas proteínas secretadas, descritas como efetores, com potencial importância nas interações patógeno-planta, entre eles estão membros das famílias de proteínas NEP-1 like proteins (NLPs) e Ceratoplataninas (CP). As NLPs causam necrose após contato com as células planta e em *M. perniciosa* identificamos uma cópia (*MpNEP2*) expressa simultaneamente com os sintomas de necrose da doença. *MpNEP2* teve sua estrutura resolvida por cristalografia e apresenta semelhanças com citotoxinas. Identificamos aminoácidos essenciais à atividade de necrose de *MpNEP2*, e analisamos sua possível dependência de íons. As CPs são proteínas descritas como elicitores de resposta de defesa em plantas, e nas espécies de *Moniliophthora* parecem ter uma função relacionada à proteção estrutural durante a doença. Análises de expressão mostraram grande diferença entre as cópias identificadas em *M. perniciosa*. Através da obtenção e análises das estruturas cristalográficas de quatro cópias de *MpCPs* sugerimos possíveis funções a essa família durante ambas as doenças. O objetivo principal deste estudo foi a compreensão dos mecanismos de ação destas duas classes de elicitores e sua relação no desenvolvimento de cada uma das doenças.

## Abstract

*Moniliophthora perniciosa* and *M. roreri* are two hemibiotrophic fungi that cause Witches' Broom and Frosty Pod Rod Diseases, respectively, in cocoa trees of Central and South America. While *M. perniciosa* infects meristematic tissues, *M. roreri* only infects fruits, but both diseases are devastating to crops. Genes described as effectors were found in genomes of both *Moniliophthora* fungi, with great potential in plant-pathogen interactions, such as members of NEP-1 like proteins family (NLPs) and Ceratoplatanins (CP). NLPs are described to cause necrosis in plant cells and we identified a copy (*MpNEP2*) that is expressed simultaneously with the diseases' necrosis symptoms. *MpNEP2* had its structure solved by crystallography and shows similarities with cytotoxins. We identified essential amino acids for the necrosis activity of *MpNEP2*, and analyze their possible dependence on ions. CPs are proteins described as plant defense response elicitors, and we suggests its function in *Moniliophthora* as structural protection. Expression analyses showed large differences between *M. perniciosa*'s copies. Through the collection and analysis of crystallographic structures of four copies of *MpCPs* we suggest possible functions for this family during both diseases. The main objective of this study was to understand the mechanisms of action of these two classes of elicitors and their relationship in the development of the diseases.

## Introdução

### *Theobroma cacao*

O cacau – *Theobroma cacao* – é originário das Américas, presente em uma região que vai desde o México até a floresta amazônica no hemisfério sul. Inicialmente o cacau – fruto do cacauero – era utilizado como uma bebida pelos povos antes da colonização europeia. Durante a civilização maia, era feita uma bebida amarga a partir de suas sementes denominada *tchocolath* – nome que originou a palavra “chocolate”. Acredita-se que o *tchocolath* era um fermentado alcoólico das sementes do cacau, usado como afrodisíaco pelos membros da realeza maia (Coady, 1998; Motamayor et al., 2002).

O nome do gênero *Theobroma* significa “comida dos deuses” e foi escolhido por Lineu, pois, segundo a cultura asteca, o fruto do cacauero foi trazido dos céus pelos deuses para a satisfação de seu povo, como um presente (Bowers et al. 2001). A palavra cacau é originária de *kakaw*, adaptada da palavra maia *cacahuatl* pelos espanhóis na época dos descobrimentos. Devido a suas virtudes maravilhosas e uso cada vez mais difundido na América, o cacau acabou se transformando em moeda – dez amêndoas valiam um coelho e com 100 era possível adquirir-se uma escrava (ABICAB).

Durante a época dos descobrimentos foi levado para a Europa, onde se tornou popular, especialmente a partir dos séculos XVII e XVIII, quando passou então a ser adoçado e utilizado na confecção de bebidas finas pela nobreza, com adição de especiarias em sua composição. O chocolate foi a primeira bebida estimulante utilizada na Europa, antes mesmo do café e do chá (Head, 1903).

Contudo, em função das necessidades climáticas para o cultivo do cacau, não é possível o seu plantio na Europa e por isso as colônias americanas de clima tropical continuaram a fornecer a matéria-prima. Inicialmente na América Central, passou para o norte da América do Sul, na região da Floresta Amazônica e a partir das Guianas foi levado à África, local de maior produção nos dias atuais (Coady, 1998).

O cacauero é uma árvore perene e de porte pequeno (4-8m de altura), da família Malvaceae (Sterculiaceae *sensu strictu*). A espécie é nativa da Floresta Amazônica, embora seu centro de diversidade estenda-se por toda a América Central até o México (Purdy e Schmidt, 1996).

Existem dois grupos genéticos de cacaveiro originais: Crioulo, que está presente a oeste dos Andes e México, e Forasteiro, presente no Brasil, leste da cordilheira dos Andes e Guianas. Um híbrido dessas duas espécies originou a variedade conhecida como Trinitário (Motamayor et al., 2002). Atualmente, a cultura do cacaveiro já é difundida entre os trópicos úmidos, sendo considerado de suma importância econômica para países do Pacífico, Sul da Ásia Oriental, Oeste e Central da África, Central e sul da América e Caribe (Wood e Lass, 1985).

A árvore dá ao mesmo tempo broto, folhas, flores e frutos. As pequenas (1-2 cm de diâmetro) e róseas flores do cacaveiro crescem em grupos diretamente no tronco e nos galhos mais antigos da árvore, enquanto os frutos são grandes (15-30 cm de comprimento por 8-10 cm de largura), amarelos ou alaranjados e pesam cerca de 500g quando maduros. Cada fruto contém cerca de 20 a 60 sementes com alta taxa de gordura, denominada manteiga de cacau.

Atualmente é consumido em diferentes formas que vão desde sólido, como barras, ovos e bombons, chocolate em pó e líquido como chocolate quente e achocolatados. Além do consumo puro é utilizado como ingrediente principal em bolos, biscoitos e sorvetes, por exemplo.

A produção mundial de cacau tem se comportado de maneira sempre ascendente. Entre 1993/94 e 2003/04 a produção mundial saiu de 2,49 para 3,6 milhões de toneladas, perfazendo um crescimento de 38,86%. A produção que mais cresceu foi a de Costa do Marfim, saindo de 840 mil toneladas para 1,4 milhões de toneladas, ocupando a primeira posição, com cerca de 40% da produção mundial (Figura 1).

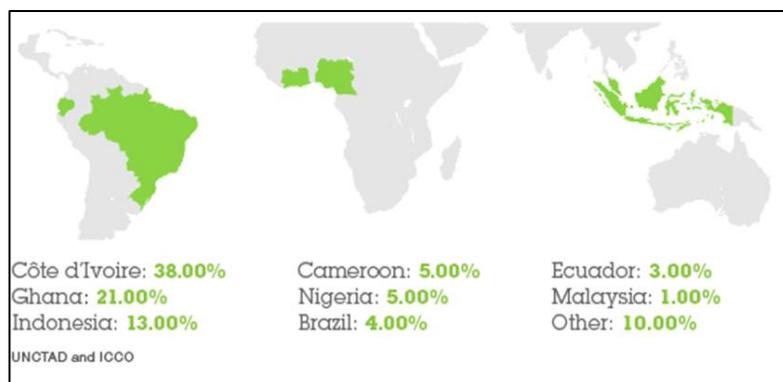


Figura 1 – Contribuição, em porcentagem, dos maiores produtores mundiais de cacau (retirado do site da UNCTAD)

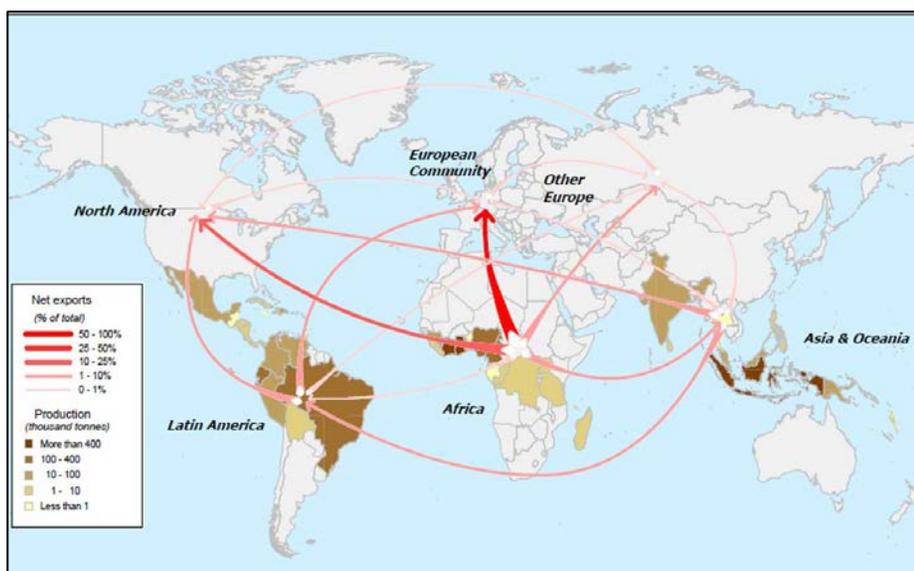


Figura 2 – Produção (em mil toneladas) e rede de exportações (em porcentagem com relação ao total mundial) de amêndoas de cacau na safra 2005/06, retirada do site da ICCO

Recentemente, estudos têm apontado para os benefícios de comer moderadamente chocolate amargo, devido especialmente à presença de flavonoides e suas ações antioxidantes, responsáveis por promover melhorias na saúde cardiovascular (Serafini et al., 2003). A produção de barras de chocolate com alto teor de cacau vem crescendo ultimamente, não só devido às pesquisas de melhorias à saúde, como também com o surgimento cada vez maior de chocolates gourmets, mais caros e com uma qualidade maior de sabores variados. No Brasil podemos citar o enorme crescimento de lojas especializadas em chocolates, como a Kopenhagen e a Cacau Show.

Se a produção mundial de chocolate no mundo vem crescendo vertiginosamente desde a década de 80, a participação brasileira nesse mercado caiu avassaladoramente, devido ao surgimento da doença Vassoura-de-Bruixa. Para se ter uma idéia, a safra de 1993/94 produziu ao redor de 320 mil toneladas e a participação do país na produção mundial estava em 14,8%; enquanto a safra de 1999/2000 foi de apenas 123,5 mil toneladas, chegando a participar com apenas 4,01% da produção mundial (CEPLAC, Figura 3).

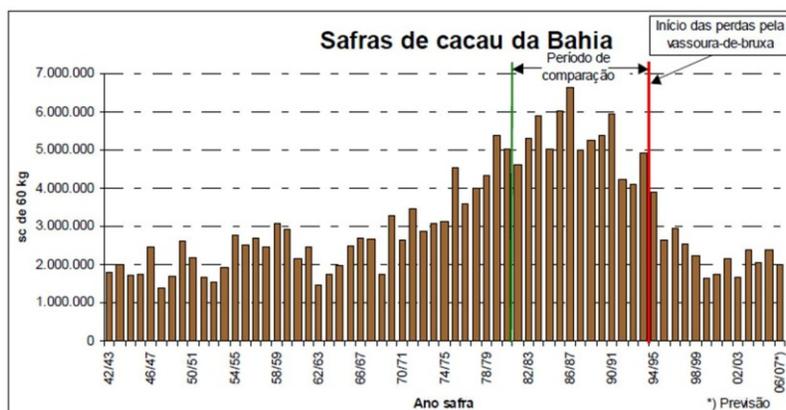


Figura 3 - Produção de sacas de amêndoas de cacau na Bahia ao longo dos anos, com destaque para o advento da Vassoura-de-Bruxa (CEPLAC)

No Brasil a plantação cacaeira encontrou seu nicho no sul da Bahia, na região da cidade de Ilhéus, devido ao clima úmido e solo f ertil, além de enorme disponibilidade de mão de obra. O estado chegou a ser responsável por cerca de 80% da produ o nacional e vinha em enorme ascensão, até o surgimento da doença Vassoura-de-Bruxa.

As perdas ocasionadas pela doença, associadas aos baixos preços das sementes de cacau atingidos no mercado internacional, fragilizou consideravelmente a situa o socioecon mica das regiões produtoras do cacau no país, onde cerca de 2,5 milhões de pessoas dependem dessa atividade (dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil).

Este problema atinge o Brasil como um todo ao afetar toda a cadeia produtiva de cacau. Devido   drástica redu o na produ o de cacau, o Brasil hoje deve importar este produto para suprir sua demanda interna, incrementando assim os custos de produ o de chocolate. As am doas importadas, em sua maioria da Indonésia, são de qualidade inferior às produzidas no país, fazendo com que o produto final seja prejudicado, diminuindo assim o valor agregado e o lucro dos produtores do chocolate.

O plantio de cacaeiros   realizado tradicionalmente no sistema conhecido como Cabruca, na sombra de árvores no interior de Mata Atlântica nativa, em fun o da importância do sombreamento e da umidade. Essa atividade desestimula o desmatamento desordenado para implanta o de culturas de menor valor econ mico, permitindo a lavoura funcionar como corredor de passagem da fauna silvestre (Alger e Caldas, 1996), além de contribuir para a manuten o e aumento da biodiversidade regional. Com as perdas das

plantações de cacau, os produtores passaram a desmatar a Mata Atlântica e começaram a criar gado no local, afetando também esse equilíbrio ecológico na região (Pereira et al., 1996).

A infestação da Vassoura-de-Bruxa em plantações de cacau da Bahia foi descoberta em 1989 (Pereira et al., 1996). Entretanto, os prejuízos materiais decorrentes da quebra de produção só começaram a ser registrados estatisticamente a partir do ano-safra agrícola de 1994/95. A Figura 3 mostra a evolução das safras de cacau da Bahia nos últimos 75 anos. Nota-se que a produção experimentou crescimento contínuo até meados da década de 90, modulado apenas pelas variações climáticas inerentes à atividade agrícola de cada ano. A partir daí, ocorreu uma queda brusca da produtividade, consequência direta da doença, que derrubou as safras baianas para os mesmos níveis baixos registrados no meio do século passado.

A destruição das lavouras de cacau não só afetou os produtores da região, como também deixou dezenas de milhares de trabalhadores rurais desempregados, fazendo com que os mesmos se mudassem para as periferias da cidade em condições subumanas de moradia. Como consequência, as grandes empresas ligadas direta ou indiretamente ao setor de produção e moagem das amêndoas de cacau faliram, causando um aumento nos custos de produção do chocolate nas grandes empresas nacionais, que foram obrigadas a importar amêndoas processadas.

Um estudo realizado pelos próprios agricultores da região de Ilhéus mostra, a partir de uma avaliação conservadora, que a perda de receita sofrida pela lavoura cacauífera da Bahia em consequência da Vassoura-de-Bruxa gira em torno de 10 bilhões de reais (Hartmann, 2006).

## **Doenças do cacauífera**

Apesar de ser de enorme importância aos países da América do Sul e principalmente ao Brasil, a Vassoura-de-Bruxa não é a única doença a afligir as plantações de cacau ao redor do mundo. Dentre as principais doenças que atingem o cacauífera, podemos observar patógenos de diferentes reinos e classes, alguns desses atingindo regiões específicas e outros espalhados por toda a região produtora de cacau ao redor do mundo.

Oomicetos são organismos eucariotos semelhantes morfológicamente a fungos, mas filogeneticamente pertencentes ao reino dos Protistas, junto às algas pardas e diatomáceas. Os gêneros *Phytophthora* e *Phytium* são responsáveis pelas doenças mais devastadoras a plantas cultiváveis, conhecidas no geral como podridão, devido ao sintoma característico de necrose (Kamoun et al., 2003). A primeira grande devastação populacional do mundo moderno foi a Grande Fome Europeia, quando um terço da população da Irlanda pereceu devido às perdas causadas por *Phytophthora infestans* nas plantações de batata na década de 1840 (Kinealy, 1994; Gráda, 2006).

Muitas espécies de oomicetos do gênero *Phytophthora* causam doenças severas aos cacauzeiros, como a “Podridão Parda” (causada principalmente por *P. megakarya* na África e por *P. palmivora* no Brasil), antiga doença que ocorre nas Américas, África e Ásia e é responsável pelas maiores perdas ao redor do globo terrestre, hoje sendo uma doença muito importante no oeste africano, maior região produtora de amêndoas no mundo (Erwin e Ribeiro, 1996).

Além dos oomicetos, muitos fungos atingem os cacauzeiros ao redor do mundo, tanto ascomicetos como basidiomicetos. *Ceratocystis cacaofunesta* é um fungo ascomiceto causador da doença conhecida como Mal-do-Facão, que atinge todos os países da América do Sul produtores de cacau. A doença foi descoberta pela primeira vez no Equador em 1918, e detectada no Brasil em 1970. A doença inicia-se com um cancro, seguido de definhamento e morte de toda a árvore de cacau. O fungo penetra na planta através de aberturas provocadas por insetos ou ferramentas, que atuam como disseminadores da doença. O seu estabelecimento é facilitado pela umidade alta e sombreamento excessivo (Ram et al., 2004; Engelbrecht e Harrington, 2005; Engelbrecht et al., 2007). Outro ascomiceto de importância é *Verticillium dahliae*, causador da “Murcho do Verticillium” nas principais regiões produtoras do mundo.

Dentre os fungos basidiomicetos encontramos o *Oncobasidium theobromae*, causador da “Morte súbita vascular”, *Moniliophthora perniciosa*, causador da “Vassoura-de-Bruxa” e *Moniliophthora roreri*, que causa a “Monília do cacauzeiro”, a primeira doença ocorrendo na Ásia e as duas últimas atingindo países da América Central e do Sul (Entwistle et al., 1972).

As plantações da Indonésia são também muito prejudicadas pelo inseto lepidóptero *Conopomorpha cramerella* causador da doença conhecida como “Cocoa Pod Borer”. Insetos sugadores da família das Miríades são responsáveis por perdas consideráveis ao redor do mundo. Também o vírus CSSV - “Cacao Swollen Shoot Virus” ataca os cacauzeiros na África Ocidental (Taylor, 1998; APSnet).

Dados retirados do site da IPARC (The International Pesticide Application Research Consortium) estimam perdas ao redor de 450 mil toneladas causadas por espécies de *Phytophthora*, 280 mil com *Moniliophthora* (sendo 250 mil apenas com a Vassoura-de-Bruxa), 200 mil causadas pelos insetos Miríades e 50 mil pelo vírus CSSV.

Entre os patógenos com maior efeito econômico no Brasil, estão *Moniliophthora perniciosa*, *Ceratocystis cacaofunesta* e algumas espécies do gênero *Phytophthora*, principalmente *P. palmivora*.

### **Vassoura-de-Bruxa**

A doença Vassoura-de-Bruxa é causada pelo fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, antigamente conhecido como *Crinipellis perniciosa* (Singer) Stahel, pertencente à família Marasmiaceae, da ordem Agaricales (Stahel, 1915; Aime e Phillips-Mora, 2005).

O fungo é originário da bacia amazônica, e foi detectado no sul da Bahia pela primeira vez em 1989 (Pereira *et al.*, 1996). Atualmente, a doença encontra-se espalhada por toda a América produtora de cacau, ocorrendo na Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Granadas, Guiana, Panamá, Peru, São Vicente, Suriname, Trindade e Tobago e Venezuela.

A Vassoura-de-Bruxa debilita as árvores de cacau através do redirecionamento de energia para as numerosas vassouras, que são ramos secos infectados pelo fungo, semelhantes às palhas de uma vassoura – daí o nome da doença. As vassouras não formam flores, o que resulta numa redução do potencial de produção de frutos (Bowers *et al.*, 2001). O fungo pode atingir diretamente os frutos, formando frutos menores chamados de morangos, e inviabilizando sua comercialização.

Durante a colonização de uma planta hospedeira, fungos patogênicos em geral podem exibir dois tipos fundamentais de nutrição: biotrófico/parasítico, que obtém nutrientes do hospede sem causar a morte celular, ou necrotrófico/saprotrofico, que matam as células hospedeiras ao redor em busca de nutrientes para sobreviver. Algumas espécies

de fungo agem como biotróficos e saprotroóficos, em diferentes estágios da doença, sendo denominados hemibiotróficos.

O ciclo de vida de *Moniliophthora perniciosa* é hemibiotrófico (Purdy e Schmidt, 1996), apresentando, portanto, dois tipos de micélio durante seu ciclo de vida (Figura 4). Os sintomas mostrados durante a Vassoura-de-Bruxa pelas árvores de cacau seguem um paralelo com o desenvolvimento hemibiotrófico de *M. perniciosa* (Evans, 1979).

O ciclo de vida do fungo começa quando os basidiósporos germinam sobre a cutícula e a base dos tricomas da planta. A penetração pode ser pelo estômato, por tecidos lesados ou pela penetração direta sem que haja a formação de apressórios (Sreenivasan, 1989). Estes tubos germinativos penetram unicamente em tecidos meristemáticos, formando um micélio haploide que invade os espaços intercelulares do tecido com hifas relativamente grossas (5-20  $\mu\text{m}$ ), irregulares, monocarióticas e com ausência de grampos de conexão (Silva e Matsuoka, 1999).

Os tecidos colonizados sofrem diversas modificações fisiológicas e hormonais, ocasionando inchaço e formação de ramos vegetativos anormais (vassouras-verdes) por toda a planta, resultantes da perda de dominância apical, além de causar anomalias nos frutos e almofadas florais (Evans, 1979; Orchard *et al.*, 1994). As vassouras são geralmente formadas entre cinco e seis semanas após a infecção.

Durante esta primeira fase, o fungo garante um suprimento de energia vivendo como um parasita intercelular obrigatório ou biotrófico, agindo como um dreno nutricional (Scarpari *et al.*, 2005).

A fase sexual é marcada pela fusão de hifas (plasmogamia ou anastomose) de dois isolados compatíveis para formar um micélio dicariótico. *M. perniciosa* possui homotalismo primário, uma vez que a mudança de hifas monocarióticas para dicarióticas ocorre sem o pré-requisito de *mating* entre hifas compatíveis (Delgado e Cook, 1976). A plasmogamia ocorre em hifas monocarióticas derivadas de um único basidiósporo uninucleado, evidenciando a natureza homotálica (autofértil) de *Moniliophthora perniciosa*.

O crescimento de *M. perniciosa* dicariorizado dá origem a um micélio de fase secundária, saprotroífico, no qual as hifas são mais finas (1,5-3  $\mu\text{m}$ ) e muito mais numerosas no interior da planta, e apresentam grampos de conexão (Silva e Matsuoka, 1999). Nesta

fase, o fungo causa necrose, apodrecimento e morte dos tecidos afetados da planta, formando assim o fenótipo da doença conhecido como vassouras-secas.

Unicamente nesta fase da vida do fungo, após alternância de períodos de seca e chuva, aparecem os basidiomas, os quais produzem numerosos esporos que espalham pelo vento ou chuva, completando o ciclo de vida de *M. pernicioso* (Evans, 1979; Andebrhan, 1987; Orchard *et al.*, 1994). As condições climáticas do sul do estado da Bahia, com períodos intermitentes de seca e umidade, favorecem a sobrevivência do fungo e a produção de esporos durante o ano todo.

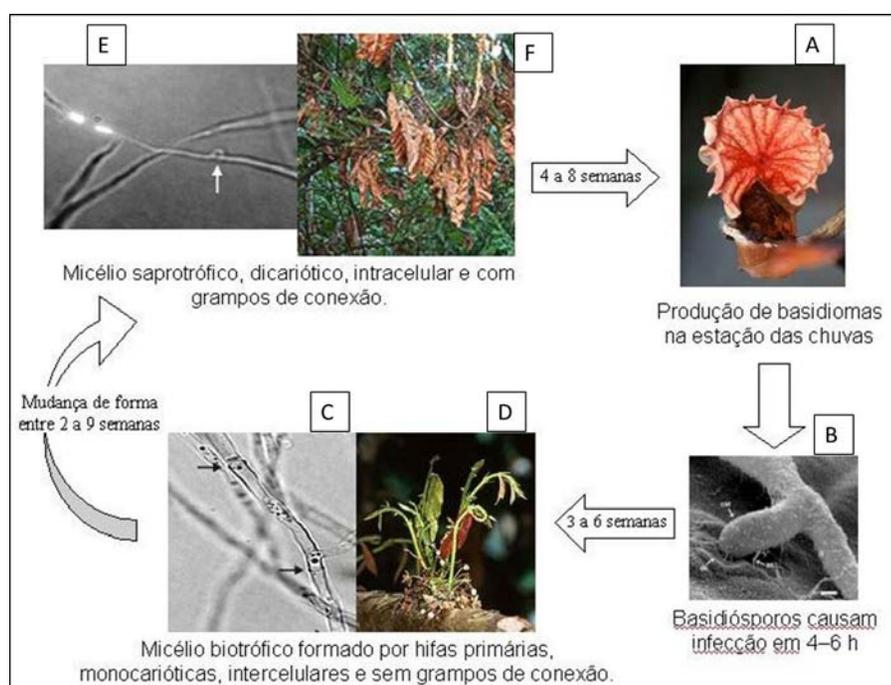


Figura 4 - Ciclo de Vida de *Moniliophthora pernicioso* em *Theobroma cacao*. A) o ciclo é iniciado pelo lançamento de basidiósporos, produzidos no basidioma, sobre a superfície da planta hospedeira; B) germinação dos basidiósporos com formação de um tubo germinativo e penetração através do estômato, tecido lesado ou diretamente; C) hifa biotrófica do micélio primário, encontrada em tecidos meristemáticos vivos do hospedeiro, conhecidos como vassouras-verdes (D); E) hifa saprotrófica do micélio secundário, encontrada nos tecidos necrosados do hospedeiro (F) e que dará origem à formação de basidiomas

## Projeto genoma Vassoura-de-Bruja

Devido ao grande problema econômico e social causado pelo fungo *Moniliophthora pernicioso* nas plantações de cacau do sul da Bahia, à falta de um método de controle eficaz contra a doença e à ausência de dados sobre a biologia básica e sobre sua interação com o

hospedeiro, foi lançado em 2001 um Programa de Genoma da Vassoura-de-Bruxa (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>).

Ao contrário de outros projetos genoma, esse programa teve como principal objetivo coordenar um conjunto de pesquisas de diferentes áreas, como biologia celular, morfologia, bioquímica, fisiologia vegetal e genética molecular, tendo os diversos pesquisadores envolvidos o apoio de um banco de dados de sequências genômicas e de cDNA do fungo. O programa tem também um forte viés pragmático, sendo seu objetivo conseguir as bases para compreensão da doença com vistas à intervenção tecnológica para o seu combate.

A comprovação do sucesso da estratégia de trabalho foi obtida através da obtenção inicial de sequências genômicas, análise integrada dos genes identificados, levantamento de hipóteses para mecanismos de patogenicidade, realização de experimentos em diferentes áreas para testar as hipóteses, integração dos experimentos e desenvolvimento de um modelo da interação do patógeno com o cacaueiro. Além disso, foi possível o desenvolvimento de um pacote tecnológico com o governo nacional, pela via de um manejo que quebra a sincronia do fungo com a planta na Bahia, o qual é a base de uma nova política pública para a recuperação do setor - o PAC do Cacau.

Desde que foi iniciado o projeto, vários estudos têm sido publicados utilizando-se dos dados, como o tamanho do genoma, polimorfismo cromossomal, variabilidade genética e o genoma mitocondrial de *M. perniciosa* (Rincones, 2003, 2006; Formighieri, 2008).

Um grande problema enfrentado pelo grupo de pesquisa foi o fato de não se conseguir desenvolver em laboratório o micélio biotrófico (ou biotrófico-like, uma vez que, por definição um organismo é biotrófico quando está vivendo dentro de material vivo de outro organismo).

Baseando-se no fato de que no interior das vassouras-verdes *M. perniciosa* enfrenta um ambiente hostil, com falta na disponibilidade de nutrientes e grande quantidade de glicerol (Scarpari *et al.*, 2005), foi criado um meio de cultura pobre, com glicerol como única fonte de carbono para a germinação dos esporos (Meinhardt *et al.*, 2006). Ao se adicionar glicose ao meio de cultura, o fungo muda de fase em alguns dias. Este fato sugere que a fonte de carbono disponível durante a infecção possa ser essencial à manutenção de suas fases. Com essa aquisição, as pesquisas puderam tomar um rumo comparativo entre a biologia, bioquímica e principalmente expressão diferenciada entre as fases do fungo.

Gesteira e colaboradores (2007) realizaram estudos de expressão durante a interação *Theobroma cacao* - *Moniliophthora perniciosa* através da confecção de uma biblioteca com ESTs. Foram encontradas 2926 sequências não redundantes, formando um amplo banco de dados com genes diferencialmente expressos em cacauzeiros resistentes e susceptíveis. É interessante observar que os dados sugerem que os genes mais expressos pelo cacau resistente estejam relacionados ao sistema de defesa, enquanto que os genes encontrados nas plantas susceptíveis sejam responsáveis pela indução da necrose e morte celular desencadeada com a doença (Gesteira *et al.*, 2007).

Em outro estudo publicado pelo nosso grupo foi descrito um método eficiente de extração de proteínas totais do apoplasto de cacauzeiros (Pirovani *et al.*, 2008). Este protocolo é de essencial valor às pesquisas com Vassoura-de-Bruca, uma vez que utilizando este protocolo, vêm sendo realizados estudos de proteômica com plantas infetadas e sadias.

Através de análises de expressão diferenciada entre as fases de vida do fungo, foi observado que a fase biotrófica é caracterizada pela repressão catabólica de carbono e nitrogênio, além da expressão de genes de fitopatogenicidade. Em contraste, o micélio saprotrófico expressa genes relacionados ao metabolismo de hexoses, amônia e fosforilação oxidativa (Rincones *et al.*, 2008). Este estudo corrobora a teoria de que o fungo enfrente dificuldades e falta de nutrientes na fase infectiva (biotrófica), enquanto na fase saprotrófica obtém ampla quantidade de nutrientes e então se desenvolve plenamente até o estágio reprodutivo (Meinhardt *et al.*, 2008).

Análises microscópicas comprovam que durante a fase saprotrófica as hifas possuem crescimento intracelular, e mostram a presença de células do hospedeiro em apoptose e o acúmulo de cristais de cálcio, seguido de acúmulo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e morte celular. A degradação ativa do oxalato, gerando mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e morte celular, pode levar a um aumento considerável na disponibilidade de nutrientes para o micélio (Ceita *et al.*, 2007). Além disso, foi descrito que o próprio fungo *Moniliophthora perniciosa* produz cristais de oxalato de cálcio. Descobriu-se um gene codificando para oxaloacetato acetil-hidrolase, que catalisa a hidrólise de oxaloacetato em acetato e oxalato, o qual pode estar diretamente relacionado com a formação dos cristais, sequestrando cálcio do ambiente (do Rio *et al.*, 2007).

Outro dado que corrobora o fato de que a infecção desencadeie a morte celular na planta foi mostrado por Scarpari e colaboradores (2005). Durante a fase de transição do fungo, nos tecidos infectados, os aminoácidos são convertidos a amidas. Essa conversão já foi mostrada como um sinal para indução de PCD (Dangl e Jones, 2001), e pode ser interpretada como uma tentativa da planta de realocar os nutrientes dos tecidos infectados.

Durante a colonização do hospedeiro, o fungo enfrenta alta concentração de ROS e grande quantidade de glicerol (Scarpari *et al*, 2005). Diferentes níveis de resistência a ROS foram observados *in vitro*, principalmente quando o fungo é crescido em meio com glicerol (Santos *et al*, 2008). Os autores inclusive cogitam a hipótese de *M. perniciosa* possuir uma resistência a ROS induzida por fontes de carbono disponíveis e, com isso, suplantar as defesas da planta durante a fase de infecção por uma resistência prévia induzida pelo glicerol no protoplasto infectado.

A fim de compreender a influência da fonte de carbono na dicarionização de *M. perniciosa*, e conseqüentemente na mudança de fase do fungo, Alvim e colaboradores estudaram a sensibilidade a agentes mutagênicos das diferentes fases do micélio, crescidos em diferentes fontes de carbono. O micélio biotrófico, crescido em meio com glicogênio como única fonte de carbono, com a adição de baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é induzido a formar grampos de conexão. Este fato não é repetido quando o mesmo micélio biotrófico é crescido em meio com glicose (Alvim *et al.*, 2009). Este fenômeno pode ser explicado por uma resposta a estresse oxidativo pré-condicionada por fonte de carbono não fermentável, como descrito para leveduras (Maris *et al*, 2000; 2001).

Dos Santos e colaboradores recentemente obtiveram sucesso na transformação de *Moniliophthora perniciosa* com dsRNA, comprovando silenciamento gênico. Este resultado é importante por descrever um método eficiente de transformação do fungo *M. perniciosa*, até então inexistente, além da possibilidade de se fazer testes de silenciamento gênico induzido (Dos Santos *et al.*, 2009).

## **Monilíase**

O fungo *Moniliophthora roreri* é um patógeno de cacauzeiros muito severo, causando uma doença conhecida como “Monília do cacauzeiro” ou “Monilíase”. Pertencente ao mesmo gênero que o fungo causador da Vassoura-de-Bruxa, também tem um ciclo de

vida hemibiotrófico. A grande diferença entre os fungos é o local de infecção, enquanto *M. royeri* ataca somente frutos em qualquer estado de desenvolvimento, *M. pernicioso* atinge toda a planta, desde que regiões meristemáticas, em fase de crescimento (Ram *et al.*, 2004).

A Monilíase é endêmica do noroeste da América Latina e foi registrada cientificamente pela primeira vez no Equador em 1917, na época da descoberta da Vassoura-de-Bruxa e do Mal-do-Facão (Ram *et al.*, 2004; Engelbrecht e Harrington, 2005). Atualmente, a Monilíase está presente em nações da América Central (como Panamá, Costa Rica, Nicarágua e Honduras) e ao noroeste da América Latina (como Equador, Colômbia e Peru) (Griffith *et al.*, 2003; Aime e Phillips-Mora, 2005), chamando a atenção dos produtores de cacau e indústrias relacionadas devido às grandes perdas econômicas que seguiram à epidemia, podendo haver declínios de até 100% da produção nas áreas atingidas (Dand, 1999).

Apesar do fungo *M. royeri* ainda não ter atingido plantações no Brasil, sua penetração é iminente (Griffith *et al.*, 2003) e já se estão adotando maneiras de manejo e cuidados para evitar a introdução (CEPLAC). A região de Madre de Dios no Peru, com presença de plantações infectadas, está a uma distância de cerca de 600 km da fronteira com o Brasil no Acre ou Amazonas. Esta distância é pequena para um patógeno eficiente e que se dissemina através do vento ou cursos de água (muito comuns na região). Portanto, a Monilíase é uma séria e real ameaça para a cacauicultura brasileira (Ram *et al.*, 2004).

A introdução da Monilíase no Brasil causaria estragos enormes, principalmente em plantações formadas unicamente por clones resistentes à Vassoura-de-Bruxa, mas suscetíveis à Monilíase. Estudos mostram que em plantações onde ambas as doenças ocorrem, a Monilíase destrói mais frutos e é mais dificilmente controlada do que a Vassoura-de-Bruxa, principalmente porque o primeiro sintoma a aparecer já é a liberação de esporos (Maddison *et al.*, 1995). Portanto, a introdução de Monilíase na região do sul da Bahia, já seriamente afetada pela Vassoura-de-Bruxa, seria um fato desastroso.

Os sintomas produzidos por *M. royeri* são caracterizados inicialmente por manchas marrons (sinais de necrose) na superfície dos frutos infectados, semelhantes às observadas quando frutos de cacau são infectados por *M. pernicioso* (Griffith *et al.*, 2003).

O genoma de *M. royeri* foi sequenciado pelo USDA (United States Department of Agriculture), chefiado pelo Dr. Lyndel Meinhardt, em colaboração com o nosso laboratório ([www.lge.ibi.unicamp.br/royeri](http://www.lge.ibi.unicamp.br/royeri)).

A semelhança de sintomas nos frutos necrose observada no fruto do cacau nas duas doenças (Vassoura-de-Bruca e Monilíase) pode ser resultante de mecanismos de ação semelhantes de cada fungo, ou de uma resposta semelhante às infecções por parte do fruto de cacau.

No genoma de *M. perniciosa* foram encontrados diversos genes que codificam pequenas proteínas secretadas, indutoras de morte celular (Mondego et al., 2008). Análises do genoma de *M. royeri* revelaram a presença das mesmas classes de proteínas. Como citado anteriormente, a semelhança de sintomas nos frutos durante as doenças pode estar relacionada com o efeito causado pelas proteínas indutoras de necrose secretadas por ambos os fungos.

Os mecanismos de defesa induzidos em plantas envolvem proteínas secretadas tanto pelo hospedeiro como pelos patógenos, sendo inibidores enzimáticos, proteases, proteínas relacionadas à patogenicidade e elicitores (O'Connell e Panstruga, 2006). Proteínas deste tipo estão descritas com papéis cruciais nas interações patógeno-planta, especialmente em fungos biotróficos (Allen et al., 2004). Em fungos hemibiotrófico como *M. perniciosa* e *M. royeri*, este tipo de proteínas pode estar relacionada com a manutenção de uma fase inicial da doença, sendo favorável ao fungo.

### **Interação planta-patógeno**

Na famosa história infantil "Alice no país das maravilhas" (Carroll, 1960), há uma curiosa passagem em que a personagem corre muito para fugir do exército de cartas de baralho, mas tudo ao seu redor corre junto com ela, tornando-se uma corrida sem fim. A Rainha Vermelha diz para Alice: “Corra o quanto quiser menina, mas não vai conseguir sair do lugar”. Essa passagem tem sido utilizada em uma perspectiva evolutiva para se comparar o que ocorre entre duas espécies em coevolução.

Biologicamente falando, coevolução é a influência evolucionária mútua entre duas espécies, que estão constantemente exercendo pressão seletiva uma sobre a outra. Como exemplo pode-se citar a relação entre flores e insetos polinizadores, a disputa entre presas e

seus predadores, e a luta entre patógenos e hospedeiros (Heylighen, 2000). Esta teoria foi denominada “Hipótese da Rainha Vermelha” pelo biólogo evolucionista Leigh Van Valen em 1973, como uma analogia ao livro de Carrol (Valen, 1973).

Na relação patógeno-hospedeiro, por mais que o segundo “corra na frente” e desenvolva novas estratégias de combate e prevenção ao seu agressor, este “corre atrás” e sempre acaba encontrando formas de superar a nova resistência adquirida. É uma corrida sem fim, mas invariavelmente disputada na natureza, e o papel da ciência nesta corrida é o de prover uma "dianteira" para os hospedeiros de interesse econômico.

A coevolução de vegetais e microrganismos patogênicos tem resultado em mecanismos de interação extremamente sensíveis e versáteis, que começam logo após o reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro. Nesta comunicação intervêm grande variedade de sinais físicos e químicos, que se continuam como uma série de eventos de transdução de sinais capazes de induzir a expressão de inúmeros genes (tanto da planta quanto do patógeno) levando a uma resposta de resistência ou susceptibilidade (Kolattukudy, 1995).

As plantas estão constantemente expostas a microrganismos. Para serem patogênicos, esses microrganismos devem conseguir acessar o interior da planta, seja penetrando diretamente através da superfície de folhas e raízes ou entrando através de aberturas como estômatos ou ferimentos. Para isso os invasores devem superar defesas primárias das plantas, barreiras físicas e químicas pré-formadas como cutículas, camadas de cera e compostos antimicrobianos produzidos constitutivamente (Chisholm *et al.*, 2006).

Uma vez no interior da planta, os patógenos enfrentam outro obstáculo, uma rígida parede celular de celulose. Após atravessar a parede celular, o invasor tem acesso à membrana celular da planta, local onde ocorrem as principais interações patógeno/hospedeiro. Nesse momento a reação pode tomar dois caminhos diferentes. Caso a planta hospedeira seja resistente ao patógeno invasor, uma rápida resposta de defesa é induzida e ocorre a prevenção do desenvolvimento da doença (interação incompatível). Por outro lado, caso a planta hospedeira seja suscetível, a doença desenvolve-se e espalha-se pela planta (interação compatível), que é incapaz de reconhecer ou responde muito lentamente ao invasor (Garcia-Brugger, 2006).

O sistema de defesa das plantas precisa ter a capacidade de distinguir entre próprio e não próprio para assegurar uma resposta eficiente, assim como ocorre no sistema imune de animais. Essa discriminação é conseguida pelo reconhecimento de determinadas moléculas de superfície ou secretadas pelos patógenos (Grennan, 2006). Apesar das plantas terem desenvolvido diversos mecanismos de reconhecimento a determinadas moléculas específicas de seus invasores, a fim de perceber o problema e exterminá-lo, os patógenos evoluíram maneiras de permanecerem despercebidos durante a colonização do hospedeiro, dificultando a ação defensiva das plantas.

Como consequência, plantas possuem um complexo sistema de respostas imunes para defenderem-se contra patógenos microbianos. Existem dois tipos diferentes de respostas desencadeados após reconhecimento de moléculas derivadas de patógenos em potencial (Jones e Dangl, 2006; Boller e Felix, 2009).

O primeiro tipo de resposta é baseado na percepção de moléculas específicas do patógeno, conhecidas como PAMPs ou MAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*. A diferença de nomenclatura é devido a uma discussão na literatura, de que nem todas as moléculas reconhecidas por plantas são oriundas de patógenos, por isso o termo MAMPs é mais usado atualmente (Bent e Mackey, 2007).

É interessante observar que esses padrões moleculares presentes nos patógenos (MAMPs) são estáveis em termos de evolução, ou seja, são componentes chave da estrutura do organismo, que não podem ser sacrificados ou mesmo alterados de forma extrema a fim de escapar do reconhecimento dos receptores da planta (Bent e Mackey, 2007).

O reconhecimento dos MAMPs ocorre por receptores específicos na superfície celular da planta hospedeira (Boller e Felix, 2009). Esse reconhecimento ativa inúmeras respostas de defesa de uma maneira inespecífica (patógeno-hospedeiro) e confere resistência a um amplo espectro de microrganismos, e por isso essa resposta é denominada Imunidade Desencadeada por PAMP, ou PTI (do inglês *PAMP-triggered immunity*; Boller e Felix, 2009).

Dentre os casos melhores documentados de PTI estão a flagelina (Felix et al., 1999), EF-Tu e harpinas produzidas por bactérias gram-negativas fitopatogênicas (Wei et al, 1992) e alguns elicitores de oomicetos e fungos. Em uma interação planta-patógeno de sucesso os

patógenos produzem e injetam moléculas dentro das células da planta através do sistema de secreção tipo III a fim de inibir a PTI.

Por outro lado, as plantas possuem proteínas de resistência a doenças que reconhecem os efetores de maneira específica, resultando em um segundo tipo de resposta imune, conhecido como Imunidade Desencadeada por Efetores, ou ETI (do inglês *effector-triggered immunity*; Boller e Felix, 2009). Dentre exemplos de ETI estão os casos descritos como resposta clássica gene-a-gene descrita por Flor, caracterizada pela presença de uma proteína receptora específica na planta (R) que reconhece uma proteína de avirulência específica do patógeno (Avr). A teoria de Flor dita que para cada gene determinando resistência no hospedeiro, existe um gene correspondente no patógeno e que interagem especificamente (Flor, 1955).

Apesar de algumas combinações de genes de avirulência-resistência terem sido descritas (Flor, 1971, Boller e Felix, 2009), a quantidade é muito baixa para o que é afirmado nessa teoria. Outra teoria tem surgido para justificar essa falta de pares específicos, a Teoria do Guarda (Marathe e Dinesh-Kumar, 2003). Neste caso, as proteínas sintetizadas por genes Avr interagem com “proteínas-guarda”, que, a partir dessa interação, seriam reconhecidas pelas proteínas R, as quais, então, induziriam a resposta de defesa. Segundo este modelo, a interação entre proteínas R e Avr seria indireta (Van der Biezen e Jones, 1998; Dangl and Jones, 2001; Marathe and Dinesh-Kumar, 2003).

Em uma interação patógeno-hospedeiro incompatível, os danos causados pelo patógeno permanecerão restritos ao local de infecção devido às respostas de defesa da planta. A mais eficiente dessas respostas é a Hipersensitiva (HR), na qual as células ao redor do local de infecção necrosam rapidamente (Goodman and Novacky, 1994). Essa resposta está associada com um conjunto de alterações metabólicas coordenadas e integradas que são essenciais ao bloqueio da propagação da infecção, assim como à capacidade do organismo defender-se de futuras infecções (Van Loon, 1997).

A morte celular programada (PCD) causada em uma HR é a consequência final de uma série de reações, como alterações no fluxo de íons na membrana celular, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), mudanças no estado de fosforilação em proteínas regulatórias, assim como transcrição de genes responsáveis pelo sistema de defesa. O

acúmulo de fitoalexinas e aumento da rigidez da parede celular também são observados no local de infecção (Van Loon e Van Strien, 1999).

Durante as respostas de defesa das plantas pode ocorrer uma resposta de defesa conhecida como Resposta Hipersensitiva (HR) a fim de conter o patógeno. Adicionalmente, as plantas desenvolveram uma elaborada rede de respostas imunes induzíveis, que se tornam ativas com uma infecção patogênica. Essa forma de resposta imune induzida é geralmente chamada de resistência sistêmica adquirida (SAR) (Ryals et al., 1996; Grant e Lamb, 2006). Fenotipicamente, a SAR confere ampla resistência a uma variedade de patógenos não relacionados (Durrant e Dong, 2004; Van Wees et al., 2008).

A figura a seguir demonstra de forma esquemática a interação entre patógeno e hospedeiro e as consequentes respostas.

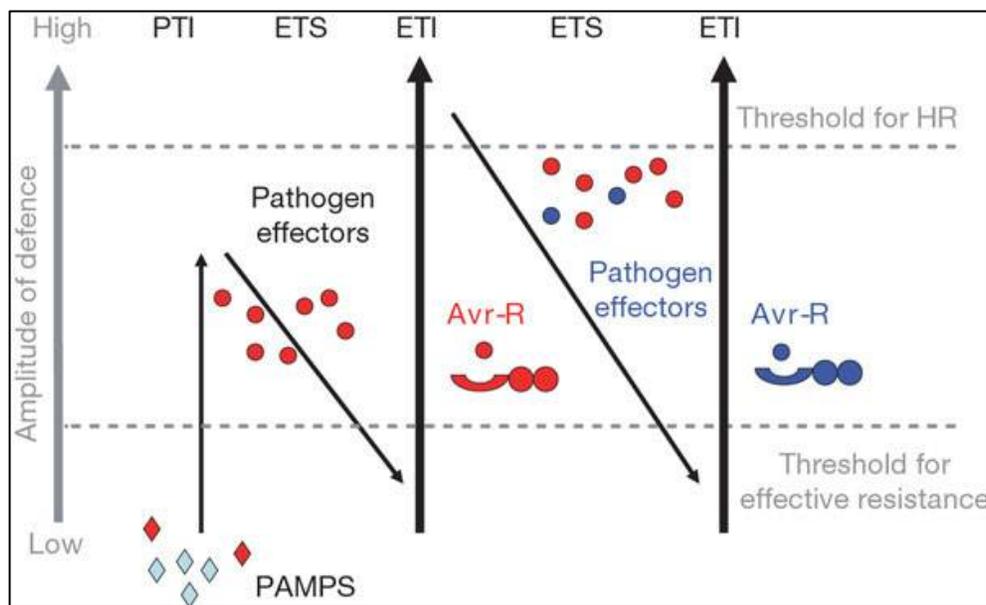


Figura 5 - Modelo da interação entre as moléculas de um patógeno e a resposta de defesa da planta. A amplitude máxima de defesa da planta é proporcional a  $(PTI - ETS + ETI)$ . Na primeira fase, a planta detecta os PAMPs (losangos vermelhos) e desencadeia PTI (PAMP-Triggered Immunity). Na fase 2, patógenos de sucesso secretam efetores que interferem com a PTI, permitindo a nutrição e dispersão do patógeno, resultando em Effector-Triggered Susceptibility (ETS). Em seguida um efector (círculos vermelhos) é reconhecido por um receptor específico (R vermelho), ativando então a Effector-Triggered Immunity (ETI), uma versão amplificada e específica de PTI que sempre ultrapassa a amplitude máxima de defesa, levando a uma resposta de hipersensibilidade (HR) e morte celular no hospedeiro. Em alguns casos pode até mesmo existir uma quarta fase, na qual o patógeno já foi selecionado evolutivamente e possui uma modificação em seus padrões moleculares reconhecíveis (losangos vermelhos, agora azuis) ou mesmo nos efetores (círculos vermelhos, agora azuis) e não é mais reconhecido pelos receptores da planta. Com isso a doença ocorre, até que novamente a planta desenvolva um receptor (R azul) capaz de reconhecer esse novo PAMP e reative o sistema de defesa (Jones e Dangl, 2006).

Este esquema complexo no qual a planta responde à presença do patógeno, este responde com novas moléculas, que geram novas respostas da planta e assim sucessivamente, justifica o porquê dessa interação ser conhecida como corrida armamentista, como ocorreu entre EUA e URSS no período da Guerra Fria (Boller e He, 2009).

Dentro dessa guerra entre as plantas e seus patógenos, uma classe de moléculas é extremamente importante tanto para o sucesso da infecção como para o sistema de defesa, os efetores (exemplificados na figura 5 como losangos e círculos). Efetores são moléculas de patógenos que manipulam a estrutura e funções celulares do hospedeiro, facilitando a infecção e/ou incitando respostas de defesa. Efetores podem ser elicitores e/ou toxinas. Diferente destes, o termo efector é neutro e não implica um impacto negativo ou positivo no decorrer da doença (Kamoun, 2006).

Fitopatógenos de diversas origens taxonômicas como bactérias, fungos e oomicetos são conhecidos por secretar e injetar efetores no apoplasto e citoplasma de plantas, a fim de estabelecer uma infecção e suprimir as defesas dos hospedeiros. Efetores podem induzir necrose nas folhas e respostas associadas à imunidade em várias espécies de plantas (Chisholm et al, 2006; Kamoun 2006; Lindeberg et al, 2008).

Entre as classes mais conhecidas de efetores, encontramos inibidores apoplásticos de enzimas produzidas pelo hospedeiro, uma série de proteínas pequenas ricas em cisteínas descritas com atividades elicitoras (Kamoun *et al.*, 1997), e efetores citoplasmáticos (Kamoun, 2006). Pequenas proteínas secretadas, como por exemplo, hidrofobinas e metalotioneínas, pertencem a famílias espalhadas entre fungos e tendem a ser secretadas no hospedeiro ou possuir uma função estrutural na parede celular dos patógenos.

Elicitores são moléculas sinalizadoras que possuem um papel importante na determinação da especificidade de hospedeiros e desenvolvimento da doença em interações compatíveis ou incompatíveis (Bent e Mackey, 2007). Elicitores são caracterizados por induzir uma cascata de reações no hospedeiro em resposta à presença de patógenos, geralmente resultando em uma resposta de hipersensibilidade necrótica, na tentativa de isolar o invasor (Nimchuk *et al.*, 2003). O estudo de elicitores tem revelado adaptações fascinantes por parte dos patógenos contra os hospedeiros, além da identificação de

processos pelo lado das plantas que contribuem a resistência à doença (Bent e Mackey, 2007).

Entre os eventos iniciais desencadeados após o contato com elicitores, pode-se incluir fosforilação e/ou ativação de proteínas da membrana plasmática (alterando o fluxo de entrada de íons na célula), ativação de proteínas quinase, *burst* oxidativo, mobilização ou geração de moléculas sinais (como cálcio livre, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio). Estas mudanças atuam na regulação de inúmeros processos, interconectando processos que amplificam e especificam a resposta fisiológica da planta, através de alterações metabólicas e transcricionais (Garcia-Brugger, 2006).

Alterações na biossíntese de fitormônios são um dos principais meios de modificação dos processos fisiológicos da planta hospedeira, levando a mudanças transcricionais apropriadas. Entre os hormônios utilizados, as plantas podem apresentar respostas de defesa contra patógenos dependentes de etileno, ácido jasmônico e ácido salicílico. Sinalização dependente de etileno é importante na resposta de plantas a patógenos, ferimentos mecânicos e ferimentos induzidos por herbivoria, já o ácido salicílico é crítico no estabelecimento de resistência local e sistêmica a bactérias, enquanto a sinalização dependente de ácido jasmônico é induzida em resposta a ferimentos mecânicos e predação por herbívoros (Thomma *et al.*, 2001).

Outro evento característico durante a resposta de imunidade das plantas é a indução de proteínas ligadas à defesa, coletivamente conhecidas como “proteínas relacionadas à patogenicidade” (PRs). Van Loon e colaboradores (1994) definiram PRs como proteínas traduzidas por plantas hospedeiras induzidas especificamente em situações patológicas. A expressão dessas proteínas não é patógeno-específica, mas determinada pelo tipo de reação de defesa da planta a qualquer situação estressante. PRs não só acumulam-se no local de infecção, como são também induzidas sistemicamente, relacionadas com o desenvolvimento de SAR contra futuras infecções por fungo, bactéria ou vírus. (Van Loon, 1999).

Uma vez que algumas PRs de tabaco foram descritas como quitinases (PR-3) (Legrand *et al.*, 1987) e beta-1-3-glucanases (PR-2) (Kauffmann *et al.*, 1987) com potencial atividade antifúngica, é sugerido na literatura que a família das PRs como um todo possa estar atuando na inibição do crescimento, multiplicação ou colonização do patógeno no

interior das plantas, sendo responsável consequentemente pelo estado de SAR (Kombrink e Somssich, 1997; Ryals et al., 1996).

Na literatura existem 14 famílias diferentes de PRs, baseadas na sequência de aminoácidos, relação serológica e atividades enzimáticas e biológicas (Van Loon et al., 1994; Tabela 1).

**Tabela 1 - As famílias de proteínas PR e suas propriedades (Van Loon et al., 1994)**

<b>Family</b>	<b>Type Member</b>	<b>Properties</b>
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknown
PR-2	Tobacco PR-2	b-1,3-glucanase
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Tobacco "R"	Chitinase type I, II
PR-5	Tobacco S	Thaumatococin-like
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor
PR-7	Tomato P <sub>69</sub>	Endoproteinase
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III
PR-9	Tobacco "lignin-forming peroxidase"	Peroxidase
PR-10	Parsley "PR1"	"Ribonuclease-like"
PR-11	Tobacco class V chitinase	Chitinase type I
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin
PR-13	<i>Arabidopsis</i> TH12.1	Thionin
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein

Milhares de patógenos têm causado perdas consideráveis na produção agrícola em todo o mundo, e dentre esses patógenos encontram-se muitas espécies de bactérias, fungos, oomicetos, vírus, nematoides e artrópodes. Através do estudo detalhado desses organismos e de seus mecanismos de interação com as diferentes espécies de plantas, é possível desenvolver estratégias de auxílio na defesa de plantas, e tentar prover certa vantagem na corrida pela evolução.

Como já mencionado anteriormente, em cacau existem quatro doenças devastadoras que atacam em repetidos intervalos as plantações de cacau: Podridão-Parda (causada pelo oomiceto *Phytophthora palmivora*), Monilíase (causada por *Moniliophthora roreri*), Vassoura-de-Bruca (causado por *Moniliophthora perniciosa*) e o Mal-do-Facão causado pelo fungo *Ceratocystis cacaofunesta* (Fulton, 1989; Ram et al., 2004). Um sintoma característico destas quatro doenças é a aparição de regiões necrosadas nos tecidos infectados, acompanhada de morte celular.

Um dado interessante é que os agentes causais destas doenças possuem em seus genomas genes que codificam moléculas descritas como elicitores de necrose e morte celular. As espécies de *Phytophthora* descritas apresentam múltiplas cópias de genes codificadores de proteínas semelhantes à NLPs (Fellbrich *et al.*, 2002); enquanto *Ceratocystis* spp apresentam cópias de genes codificadores de CPs (Pazzagli *et al.*, 1999). Já os fungos *M. pernicioso* e *M. royeri* codificam proteínas pertencentes a ambas as famílias, e foi observada uma possível intensificação dos efeitos de necrose quando ambas as proteínas atuam em conjunto (Zaparoli *et al.*, 2009).

## NLPs

Dentro do amplo universo de proteínas secretadas por fitopatógenos, foram descritas proteínas indutoras de necrose ou fatores de necrose com alto grau de similaridade na sequência de aminoácidos. Esta semelhança sugeriu a existência de uma família de proteínas indutoras de necrose, presente em diversos organismos filogeneticamente distantes como bactérias, fungos e oomicetos.

A primeira proteína descrita dessa ampla família foi a NEP1 (*Necrosis and Ethylene Inducing Protein 1*), do ascomiceto *Fusarium oxysporum* (Bailey, 1995), e por este motivo a família passou a se chamar NLP (*NEP1 Like Protein*) (Pemberton e Salmond, 2004).

A proteína NEP1 foi identificada e purificada do filtrado de cultura do fungo ascomiceto *Fusarium oxysporum*. Foi constatada e descrita sua capacidade de causar necrose e produção de etileno em folhas de coca (*Erythroxylum coca*) e descrita como um elicitador de respostas de defesa. A proteína induz necrose e produção de etileno em diferentes plantas testadas com diversos graus de intensidade, em dicotiledôneas, mas não em monocotiledôneas (Bailey *et al.*, 1995).

A família das NLPs conta hoje com mais de 100 membros (123 entradas no NCBI dia 24/05/2012) em 44 espécies diferentes de seres vivos, taxonomicamente diversos como bactérias, oomicetos e fungos ascomicetos ou basidiomicetos (Koch, 1998; Kamoun, 2003; Fellbrich, 2002; Qutob, 2002; Bell, 2004). Na literatura foi detectado efeito de necrose em todas as plantas dicotiledôneas testadas, mas nenhuma monocotiledônea é afetada pelas NLPs (Gijzen e Nurnberger 2006).

Os membros da família NLP são proteínas pequenas (24 kDa em média), com a presença de um peptídeo sinalizador para secreção. São proteínas caracterizadas pela presença de um heptapeptídeo conservado GHRHDWE, e a presença de duas ou quatro cisteínas formadoras de uma ou duas ligações dissulfeto respectivamente, característica que as divide em dois grupos (Gijzen e Nurnberger 2006). O domínio conservado de nome NPP1 foi descrito para a família (Fellbrich et al., 2002) e consiste basicamente de toda a sequência primária de aminoácidos, com exceção da região do peptídeo sinal.

Como exemplos de bactérias com cópias de NLPs em seus genomas podemos citar *Bacillus halodurans* e *Streptomyces coelicolor*, bactérias de solo não patogênicas (Qutob et al., 2002); *Erwinia carotovora*, bactéria causadora de podridão em diversas espécies de plantas (Bell et al., 2004); *Vibrio pomerensis* pertencente a um gênero patogênico de animais, mas é uma espécie não patogênica (Pemberton e Salmond, 2004); e *Frankia* sp, outra espécie não patogênicas (Qutob et al., 2006).

Dentro dos oomicetos, membros da família NLP foram encontrados em praticamente todas as espécies de *Phytophthora* e *Phythium* estudadas, entre elas *Phythium aphanidermatum*, *P. midletonii*, *P. monospermum* e *P. vanterpoolii* (Koch et al., 1998; Qutob et al., 2006) e *Phytophthora parasitica*, *P. sojae*, *P. infestans* e *P. megakarya* (Fellbrich et al., 2002; Pemberton e Salmond, 2004; Bae et al., 2005).

Em fungos existem genes homólogos às NLPs presentes nos genomas de ascomicetos fitopatogênicos como *Verticillium dahliae* (Wang et al., 2004), *Magnaporthe grisea* (Dean et al., 2005), *Gibberella zeae* (Qutob et al., 2006), *Botrytis elliptica* e *B. cinerea* (Staats et al., 2007; Schouten et al., 2008). Alguns ascomicetos não patogênicos, como *Neurospora crassa* (Pemberton e Salmond, 2004), e causadores de infecções apenas de animais como diferentes espécies de *Aspergillus* (Qutob et al., 2006) também possuem genes pertencente à família NLP.

Uma das únicas espécies de fungos basidiomicetos com a presença de membros da família das NLPs em seu genoma é *Moniliophthora perniciosa* (Garcia et al., 2007). Análises filogenéticas e genômicas indicam que os genes dessa família foram obtidos por transferência horizontal, provavelmente de uma espécie de *Phytophthora* durante infecção de um fruto de cacaueteiro (Tiburcio et al., 2010).

Um aspecto intrigante das NLPs é a formação de enormes famílias multigênicas em um mesmo genoma, principalmente nos oomicetos. Sequências do genoma de *Phytophthora sojae* e *P. ramorum* mostram a presença de aproximadamente 50 e 60 cópias de NLPs respectivamente, embora se acredite que mais da metade dessas cópias sejam pseudogenes (Tyler et al., 2006). Em *P. megakarya*, nove cópias foram descritas em *clusters*, sendo pelo menos seis expressas (Bae et al., 2005). Recentemente, foram descritas 18 cópias em *Phytophthora capsici*, das quais 12 tiveram suas expressões confirmadas por RT-PCR após crescimento *in vitro* (Feng et al., 2011).

Dentre os fungos, *M. grisea* e *G. zeae* possuem quatro cópias, sendo que *M. grisea* possui membros com 2 e com 4 cisteínas (Dean et al., 2005; Gijzen e Nurnberger, 2006), enquanto *A. nidulans* e *A. fumigatus* possuem apenas duas cópias e *N. crassa* somente uma cópia (Galagan et al., 2005). Recentemente, 8 homólogos a NLPs foram preditos no genoma do fungo *Verticillium dahliae*, em um isolado de repolho (Klosterman et al. 2011). Outro grupo de trabalho descreveu nove cópias em um isolado virulento do fungo *Verticillium dahliae* isolado de algodão, das quais apenas duas cópias tiveram sua atividade de causar necrose e elicitar respostas de defesa em plantas comprovada (Zhou, et al 2012). Apesar disso, esse grupo de autores constatou que tanto VdNLP1 quanto VdNLP2 são indispensáveis para o sucesso da infecção de plantas de algodão.

Em *Moniliophthora perniciosa* foram detectados três genes que codificam para proteínas com significativa similaridade às proteínas da família de NLPs, todos localizados num mesmo cromossomo do genoma (Garcia et al., 2007).

A existência de famílias gênicas dentro de um mesmo genoma pode estar ligada com a evolução desses genes durante a evolução dos organismos, tendo passado tempo suficiente para a divergência de duplicações em diferentes organismos, conforme a teoria “birth-and-death” (Nei e Rooney, 2005). Duplicações e mutações gênicas ocorrem durante um processo evolucionário de adaptação a diferentes nichos. Como resultado desse processo os genes podem divergir tanto em estrutura ou padrões de expressão, ou mesmo tornarem-se não funcionais como pseudogenes, e serão eventualmente removidos do genoma (Garzón-Ospina et al., 2010).

A presença de uma ou mais cópias de genes da família NLP em genomas de organismos tão distantes filogeneticamente e com modos de vida tão diversos faz surgir

dúvidas quanto à verdadeira função dessas proteínas. Como descrito anteriormente, estão presentes em bactérias, fungos e oomicetos, fitopatogênicos, oportunistas de animais ou mesmo com vida saprofítica. Também está presente no fungo *Mycosphaerella graminicola*, e é comprovadamente expresso durante a doença que atinge apenas trigo, uma planta monocotiledônea, sendo que as NLPs não possuem atividade descrita nesse tipo de plantas (Motteram et al., 2009).

O ascomiceto *Botrytis elliptica* possui duas cópias de NLPs, embora cause doença apenas em lírio, uma planta monocotiledônea. Mutantes silenciados em ambas as cópias não sofrem nenhuma alteração fisiológica ou de virulência (Staats et al., 2007). A presença dessas cópias em um hospedeiro de monocotiledôneas pode estar relacionada com troca de hospedeiro durante a evolução da espécie, uma vez que outras espécies do mesmo gênero *Botrytis* atacam dicotiledôneas e também possuem NLPs (Staats et al., 2007).

Apesar de inúmeras possibilidades terem sido propostas sobre as funções das NLPs em fitopatógenos, ainda não está totalmente esclarecida sua função, modo de ação ou mesmo seu papel na virulência. Dezesesseis anos se passaram desde a descoberta do primeiro membro da família por Bailey e duas revisões foram escritas (Pemberton e Salmond, 2004; Gijzen e Nurnberger, 2006). Estudos realizados em várias plantas mostram que as NLPs ativam respostas associadas à defesa, como síntese de fitoalexinas e etileno, acúmulo de transcritos de defesa (genes PR) e geração de necrose, resposta hipersensitiva e morte celular no local de infecção (Jennings et al., 2001; Veit et al., 2001; Fellbrich et al., 2002; Keates et al., 2003; Mattinen et al., 2004; Bae et al., 2006).

As respostas geradas por plantas após contato com NLPs de *Phytophthora* são muito semelhantes às observadas após contato com o elicitor flagelina Flg22, presente em bactérias. Respostas como a rápida geração de NO e ativação de MAPKs e superexpressão de genes relacionados à defesa ocorrem simultaneamente em plantas inoculadas com NLP ou Flg22, mostrando que uma resposta característica de defesa a patógenos está ocorrendo (Qutob et al., 2006). Respostas de defesa semelhantes foram descritas em cacauzeiros após contato com NEP1 e em comparação com inoculação do oomiceto *Phytophthora megakarya* (Verica et al., 2004; Bailey et al., 2005).

Esses resultados relacionam as NLPs a elicitores de resposta de defesa em plantas, ou MAMPs, assim como Flg22 (Pemberton e Salmond, 2004). Apesar disso, algumas

respostas como existência de morte celular localizada e a independência de proteínas da planta do tipo caspase durante a resposta de defesa, são incompatíveis com a resposta clássica a elicitores e MAMPs. Além disso, em mais de 15 anos de estudos, não foi encontrado um receptor proteico em plantas responsável pelo reconhecimento de NLP.

A morte celular desencadeada após contato com NLP lembra reações de Morte Celular Programada, como fragmentação de DNA (Veit et al., 2001; Wang et al., 2004) e necrose localizada. Por outro lado, a morte causada por NLP parece ser independente de hormônios associados a defesa, como jasmonato, ácido salicílico ou etileno (Pieterse e Van Loon, 2004; Qutob et al., 2006). Esses resultados sugerem que a atividade das NLPs seja mais semelhante à de uma toxina do que de um elicitor.

Além disso, foi detectado em folhas após inoculação com NEP1, destruição da cutícula, do envelope de cloroplastos e das membranas celulares (Keates et al., 2003). Muitos experimentos realizados com NLPs de *Phytophthora* indicam que a resposta de necrose é ativa por parte da planta, as NLPs precisam entrar em contato com o lado extracelular da membrana celular da planta, apenas em dicotiledôneas (Qutob et al., 2006).

Schouten e colaboradores (2008) confeccionaram o heptapeptídeo conservado GHRHDWE e realizaram testes em células de plantas. O peptídeo isoladamente não causa necrose e nem diminui a atividade da proteína BcNEP de *B. cinerea*, levando à conclusão de que BcNEP não possui um ligante, ou que a ligação não é feita através do peptídeo.

A expressão dos genes NLPs vem sendo estudada e descrita durante a última década. Em *Erwinia carotova*, *Nep* é expresso apenas quando a bactéria cresce em meio sólido (Mattinen et al, 2004), mesmo caso de *SsNEP2* do fungo *S. sclerotiorum*, que é expresso logo após contato com a folha da planta ou outra superfície sólida (Bashi et al, 2010). Em *Moniliophthora perniciosa* observamos uma expressão dos genes NLPs maior na fase biotrófica do que na necrotrófica quando o fungo cresce *in vitro* (Garcia et al, 2007).

Além disso, em *Magnaporthe grisea* a expressão de *MgNLP* apresenta um pico de momentos antes dos primeiros sintomas da doença aparecerem, seguida de uma queda na expressão durante os sintomas de necrose (Motteram et al., 2009), assim como *NPP1* de *Phytophthora parasitica*, expresso durante a transição de fase biotrófica para necrotrófica

do oomiceto, no decorrer da doença, quando os sintomas de necrose estão mais aparentes (Qutob et al., 2002).

Recentemente a estrutura cristalográfica de um membro da família das NLPs (NLP<sub>PyA</sub> de *Phytium aphanidermatum*) foi descrita (PDB - 3GNU). A estrutura lembra a de actinoporinas, toxinas formadoras de poros produzidas por anêmonas marinhas (Ottman et al., 2009). Os autores concluem que NLPs são fatores conservados de virulência que causam permeabilização da membrana plasmática e citólise de células de plantas. Além disso, ressaltam a importância da estrutura proteica e de um íon divalente para a manutenção da atividade de necrose.

Uma vez que plantas são capazes de perceber mudanças celulares induzidas por danos em suas membranas como, por exemplo, a liberação de elicitores endógenos ou mudanças na homeostase de íons, NLPs provavelmente ativam o sistema de defesa de plantas através da interferência com a integridade dos tecidos (Ottman et al., 2009; Kuffner et al., 2009).

Apesar de quase vinte anos de estudos com as NLPs desde a descrição da NEP1 por Bailey (1995), muito ainda é discutido referente à maneira como essas proteínas causam necrose em células dos hospedeiros e mais ainda sobre sua real função em fungos não patogênicos ou que atingem monocotiledôneas.

### **Ceratoplataninas (CPs)**

A primeira proteína da família das Ceratoplataninas (CPs) foi purificada do meio de cultura do fungo ascomiceto *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*, patógeno de plátanos (*Platanus* sp) (Pazzagli et al., 1999).

A proteína Ceratoplanina de *C. fimbriata* é uma proteína secretada, composta por 120 aminoácidos (12,4 kDa) e forma duas ligações dissulfeto intramoleculares (Pazzagli et al., 1999). A Ceratoplanina tem um papel na interação fungo-patógeno, uma vez que induz morte celular, síntese de fitoalexinas e superexpressão de genes de defesa (Scala et al, 2004; Fontana et al, 2008). Por estas razões, a Ceratoplanina e as outras proteínas da família de mesmo nome Ceratoplanina (que aqui denominaremos CP apenas, para evitar problemas de nomenclatura) são consideradas MAMPs (de Oliveira et al, 2011).

Sua aplicação em folhas de tabaco induz a produção de fitoalexinas e necrose localizada, descrita como morte celular programada (reações características de defesa de plantas a elicitores) (Garcia-Brugger et al., 2006; Pazzagli et al., 2009). Boddi e colaboradores identificaram por imunolocalização a CP na parede celular de ascósporos, hifas e conídios de *C. fimbriata*, sugerindo um possível papel estrutural para essa proteína (Boddi et al., 2004).

Os membros da família CP são secretados por fungos fitopatogênicos, patógenos humanos, e espécies não-patogênicas. Foi mostrado que essas proteínas podem atuar tanto como fatores de virulência e efetores, como no caso de SnodProt1 de *Phaeosphaeria nodorum* e SP1 de *Leptosphaeria maculans* (Wilson et al, 2002; Jeong et al, 2007). Também podem atuar como MAMPs e elicitores, como Sm1 e Epl1 dos fungos de solo *Trichoderma virens* e *Hypocrea atroviridis*, respectivamente (Djonovic et al, 2007; Seidl et al, 2006). Em particular, Sm1 elicit a produção de ROS e induz a expressão de genes relacionados à defesa em plantas, confirmando a capacidade de controle biológico de *T. virens*, enquanto Epl1 é a proteína mais encontrada no secretoma de *H. atroviridis* (Vargas et al., 2008).

Outros membros da família CP têm participação crucial em interações entre fungos e animais, quando exibem propriedades alergênicas, induzindo fortes reações imunológicas, como no caso das proteínas CS de *Coccidioides immitis* e Asp13 de *Aspergillus fumigatus*, ambos causadores de doenças pulmonares em humanos (Pan e Cole, 1995; Rementeria et al, 2005) e da proteína Aca1 do fungo medicinal *Antrodia canphorata* (Hseu et al, 2005).

Atualmente, a família das CPs inclui muitas proteínas (423 entradas em 111 espécies diferentes de fungos no PubMed em 01/07/2012) com sequências similares. Entretanto, ainda não foi identificado um mecanismo de ação, ou mesmo sua função biológica para os fungos.

Outro fato ainda desconhecido é o mecanismo pelo qual as CPs elicitam respostas em plantas, se esse é um efeito desejado pelo fungo, ou se a CP é reconhecida de maneira direta ou indireta. Existem concentrações de CPs que promovem respostas de defesa no tecido vegetal sem ocorrer Resposta Hipersensitiva ou necrose por parte da planta hospedeira (Zaparoli et al., 2009; Pazzagli et al., 2009), havendo um aumento da resistência

contra o ataque de patógenos devido ao acúmulo de compostos fenólicos, plasmólise, morte celular e a expressão diferencial de diversos genes relacionados à defesa e estresse.

Pazzagli e colaboradores (2009) levantam a hipótese de que o acúmulo de CP altere estruturalmente a membrana celular vegetal, desestabilizando o equilíbrio redox e iônico da célula, levando, em última instância, à morte celular.

Como já dito anteriormente, algumas proteínas da família das CPs foram descritas como elicitoras de respostas de defesa em plantas, e outras ainda como indutoras de SAR. Estas respostas são sempre sucessivas ao acúmulo de fitoalexinas, expressão de genes de defesa e produção de ROS (Wilson et al., 2002; Scala et al., 2004; Carresi et al., 2006; Djonovic et al., 2006; Seidl et al., 2006; Vargas et al., 2008).

Foi mostrado que a proteína SM1 de *Trichoderma virens* induz resistência sistêmica em plantas de algodão adquirida após contato, contra o patógeno foliar *Colletotrichum* sp., além de ser necessária para o mesmo patógeno ser capaz de induzir resistência em milho (Djonovic et al., 2006, 2007, Vargas et al., 2008). A deleção ou superexpressão desse gene em *T. virens* não altera a morfologia, o crescimento ou mesmo a capacidade de colonizar o hospedeiro, mas altera a indução de resistência no hospedeiro após contato (Djonovic et al., 2006). Em situação semelhante, a deleção do gene Sp1 de *L. maculans* também não altera sua capacidade de infectar plantas de nabo (Wilson et al., 2002). A capacidade de infecção do próprio *C. fimbriata* em *Platanus acerifolia* diminui em folhas tratadas previamente com CP (Fontana et al., 2008).

Outra cópia de CP descrita é o gene *MgSM1*, expresso pelo patógeno *Magnaporthe grisea* durante a infecção de arroz, que foi descrito com os níveis de expressão aumentando ao longo da doença e da evolução dos sintomas (Yang et al., 2009). A expressão de *MgSM1* em *Arabidopsis* resultou em respostas do tipo HR (com necrose localizada) e aumento das respostas de defesa contra *Botrytis cinerea* e *Pseudomonas syringa*.

O mesmo estudo detectou um aumento da expressão de genes de defesa, como *PRI* e *PR5*, nas folhas de *Arabidopsis* superiores a qual ocorreu a indução do gene *MgSM1*, confirmando a indução de resistência sistêmica. Além disso, plantas de *Arabidopsis* transgênicas expressando o gene *MgSm1* mostraram resistência de amplo espectro contra *B. cinerea*, *Alternaria brassicicola* e *P. syringae*, através da ativação de respostas de defesa, incluindo geração de ROS. (Yang et al., 2009).

A proteína BcSpl1, produzida pelo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, é um dos membros descritos da família das CPs com características mais agressivas, apresentando indução de HR com reação de necrose intensa quando inoculado em plantas de tabaco, tomate e *Arabidopsis* (Frías et al., 2005). Genes de defesa da planta, como *PR1* e *PR5*, além de *HIN1* característico de HR, foram induzidos logo após a aplicação de BcSpl1 em plantas de tabaco. Em um estudo do secretoma durante a interação de *B. cinerea* com tomate, BcSpl1 está entre as dez proteínas mais abundantes. Mutantes desse fungo sem o gene CP mostraram uma diminuição na virulência em plantas de tabaco e tomate (Frías et al., 2005).

Recentemente foi descrita a primeira estrutura tridimensional de uma proteína da família das CPs, a Ceratoplatanina de *Ceratocystis platani*, através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (de Oliveira et al., 2011). CP exibe um enovelamento do tipo “*double-psi-beta-barrel*” muito similar ao encontrado em expansinas, endoglucanases (Castillo et al., 1999) e na proteína de defesa de plantas *barwin* (Ludvigsen e Poulsen, 1992). Expansinas são encontradas primariamente em plantas, com um papel crucial no afrouxamento da parede celular para crescimento da planta (Sampedro e Cosgrove, 2005). Endoglucanases são enzimas que catalisam a hidrólise de celulose a oligossacarídeos menores em plantas, bactérias e fungos (Henrissat e Bairoch, 1996). Apesar da CP não mostrar atividade lítica contra carboidratos, ela liga-se a oligossacarídeos, como oligo-N-acetilglucosamina (de Oliveira et al., 2011).

Apesar de diversos estudos com membros da família das CPs, incluindo a caracterização estrutural de um dos membros, pouco se sabe sobre sua função durante a interação com os hospedeiros. Parece ser um consenso que as CPs sejam reconhecidas como MAMPs pelo sistema de defesa das plantas, mas o que isso significa para o próprio patógeno ainda é um mistério.

## CAPÍTULO I – NLPs de *M. pernicioso* e *M. roreri*

A maior parte dos dados obtidos com as NLPs de *M. pernicioso* está publicada no artigo da página 39 “*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*” (Zaparoli et al., 2011), com exceção dos experimentos de análise de toxicidade em células de cacau em cultura, que serão analisados logo a seguir. Os dados obtidos referentes às NLPs de *M. roreri* não foram publicados e serão apresentados após o artigo, no final deste capítulo. Um pedido de patente foi depositado com relação a MpNEP2 e também será melhor discutido nesse capítulo.

### **Análise de toxicidade de MpNEP2 em células de cacau.**

A fim de verificar a ação das NLPs de *M. pernicioso* em cacau, organismo hospedeiro natural do fungo, elaboramos um experimento com células de cacau em cultura desafiadas com MpNEP2.

Seguindo um protocolo adaptado de Hall e Collin (1975), obtivemos uma cultura de células de cacau a partir de folhas. Para a realização do experimento, células de cacau após três dias de repicadas foram transferidas para erlenmeyers com 10 mL de meio (Hall e Collin, 1975). Após 1h da transferência foi adicionado 0,5 mg/ml de proteína MpNEP2 purificada, e 48 horas depois as células foram analisadas.

A figura 6 mostra células retiradas da cultura visualizadas em microscopia com o corante FDA. Este corante é utilizado para diferenciar células vivas de células mortas facilmente, uma vez que o FDA é hidrolisado apenas no citoplasma de células vivas, liberando fluoresceína detectável em verde com o comprimento de onda de 490 nm (Burdridge *et al.*, 2006). Podemos observar que os efeitos da MpNEP2 na cultura de células, na concentração e no tempo do experimento matando 100 % das células observadas.

Diminuindo o tempo de visualização no microscópio de fluorescência para 6 horas após o contato com MpNEP2, conseguimos observar um grupo de células sofrendo extravasamento do conteúdo citoplasmático, provavelmente após rompimento de parede e membrana celular, ocasionados pelo contato com MpNEP2 (figura 7).

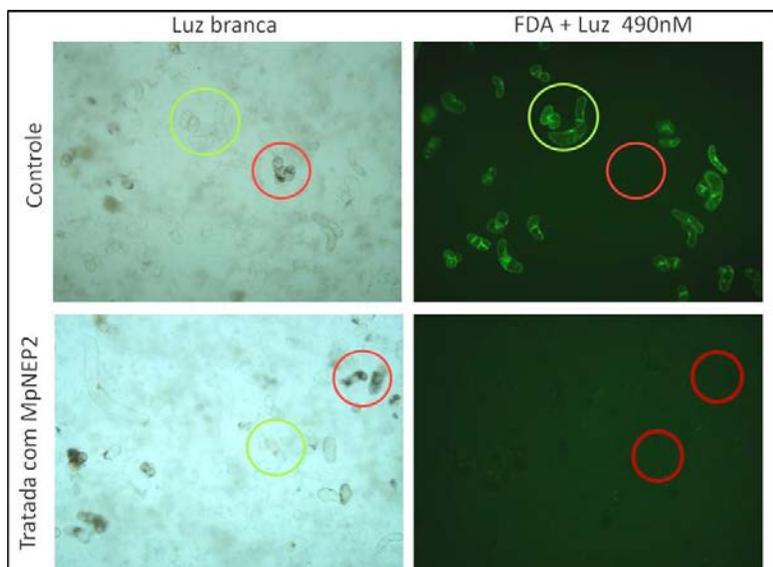


Figura 6 - Análise por microscopia de fluorescência de células de cacau tratadas com 0,5 mg/mL de MpNEP2 48 horas após tratamento. Com luz branca observamos células com aparência de vivas (círculos verdes) e células com aparência de mortas (círculos vermelhos). Utilizando-se o filtro de luz a 490 nm observamos as células vivas fluorescendo em verde devido ao corante FDA (círculo verde), enquanto as células mortas não fluorescem (círculos vermelhos).

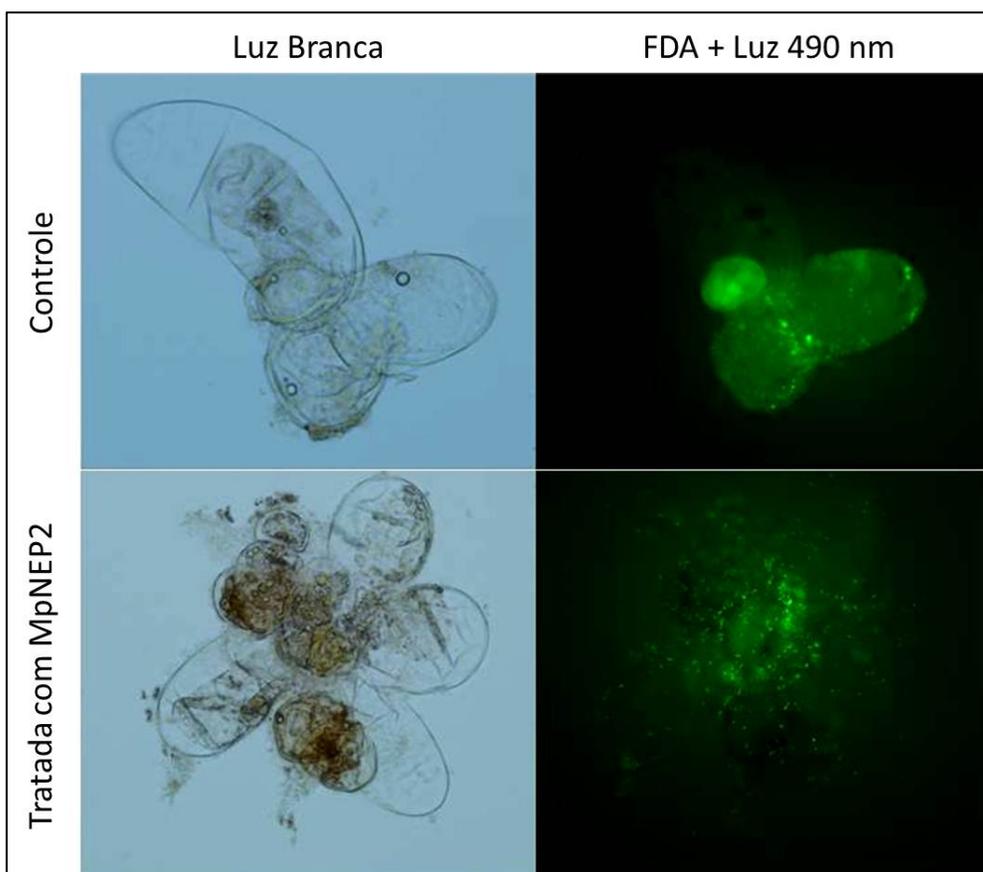


Figura 7 - Análise por microscopia de fluorescência de células de cacau tratadas com 0,5 mg/mL de MpNEP2 6 horas após tratamento. Utilizando-se o filtro de luz a 490 nm observamos as células vivas fluorescendo em verde devido ao corante FDA. Com o tratamento com MpNEP2, apenas alguns pontos fluorescem em verde, fora da delimitação de uma célula, levando à conclusão de extravasamento do conteúdo citoplasmático.

Observando o nível de destruição causado pelo contato de MpNEP2 com as células de cacau, inferimos que o extravasamento do conteúdo celular poderia estar gerando respostas de defesa nas plantas como se fossem MAMPs.

O artigo a seguir, juntamente com o que foi descrito por Kuffner e colaboradores (2009), reforça a ideia de que as respostas de defesa observadas nos hospedeiros após contato com as NLPs (Qutob et al., 2006, Fellbrich et al., 2002) não são causadas em resposta à presença da proteína, mas sim como uma resposta à destruição que a mesma causa nas células do hospedeiro. A planta hospedeira reconheceria, portanto, a ação das NLPs ao invés da própria proteína como um elicitor. Através de mutações em aminoácidos, comprovamos a existência de regiões essenciais à ação citolítica, integrantes do heptapéptido conservado e de uma possível região hidrofóbica de ancoramento nas membranas de células da planta.

Foi constatado também que a proteína MpNEP2 não necessita de íons para ativar necrose celular, ao contrário do que foi descrito para *P. aphanidermatum* (Ottman et al., 2009). Além disso, foi cogitada a hipótese de que durante a doença a mudança de fase para vassoura-seca estivesse sendo auxiliada por esta proteína, hipótese que ganha força após a análise de expressão de MpNEP2 durante a doença.

# 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

Gustavo Zaparoli,<sup>†,‡</sup> Mario Ramos de Oliveira Barsottini,<sup>†,‡</sup> Juliana Ferreira de Oliveira,<sup>‡</sup> Fabio Dyszy,<sup>§</sup> Paulo José Pereira Lima Teixeira,<sup>†</sup> Joan Grande Barau,<sup>†</sup> Odalys Garcia,<sup>†</sup> Antonio José Costa-Filho,<sup>§</sup> Andre Luis Berteli Ambrosio,<sup>‡</sup> Gonçalo Amarante Guimarães Pereira,<sup>†,‡</sup> and Sandra Martha Gomes Dias<sup>\*,‡</sup>

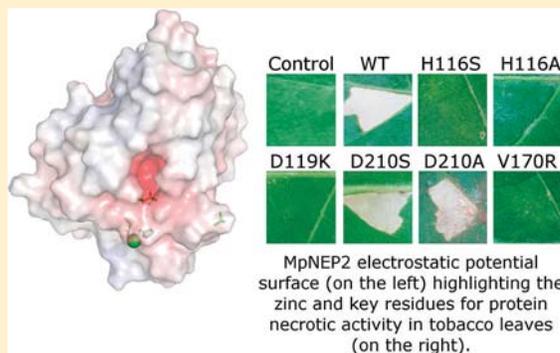
<sup>†</sup>Departamento de Genética e Evolução, IB/UNICAMP, C.P. 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

<sup>‡</sup>Laboratório Nacional de Biociências-LNBio, Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

<sup>§</sup>Grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, C.P. 369, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

## S Supporting Information

**ABSTRACT:** The necrosis- and ethylene-inducing peptide 1 (NEP1)-like proteins (NLPs) are proteins secreted from bacteria, fungi and oomycetes, triggering immune responses and cell death in dicotyledonous plants. Genomic-scale studies of *Moniliophthora perniciosa*, the fungus that causes the Witches' Broom disease in cacao, which is a serious economic concern for South and Central American crops, have identified five members of this family (termed MpNEP1–5). Here, we show by RNA-seq that MpNEP2 is virtually the only NLP expressed during the fungus infection. The quantitative real-time polymerase chain reaction results revealed that MpNEP2 has an expression pattern that positively correlates with the necrotic symptoms, with MpNEP2 reaching its highest level of expression at the advanced necrotic stage. To improve our understanding of MpNEP2's molecular mechanism of action, we determined the crystallographic structure of MpNEP2 at 1.8 Å resolution, unveiling some key structural features. The implications of a cation coordination found in the crystal structure were explored, and we show that MpNEP2, in contrast to another previously described member of the NLP family, NLP<sub>Pva</sub> from *Pythium aphanidermatum*, does not depend on an ion to accomplish its necrosis- and electrolyte leakage-promoting activities. Results of site-directed mutagenesis experiments confirmed the importance of a negatively charged cavity and an unforeseen hydrophobic  $\beta$ -hairpin loop for MpNEP2 activity, thus offering a platform for compound design with implications for disease control. Electron paramagnetic resonance and fluorescence assays with MpNEP2 performed in the presence of lipid vesicles of different compositions showed no sign of interaction between the protein and the lipids, implying that MpNEP2 likely requires other anchoring elements from the membrane to promote cytolysis or send death signals.



Witches' Broom disease of cacao (*Theobroma cacao*), the raw material for chocolate production, is well-regarded as one of the most important phytopathological problems to afflict the southern hemisphere in recent decades, with devastating consequences to the agro-economy of the affected countries.<sup>1</sup> In Brazil, this disease started as an endemic disease within the Amazon region, but after an outbreak in 1989, it was introduced into the largest area of cacao production, the state of Bahia.<sup>2</sup> A severe decrease in the production of cacao then followed, and in less than a decade, Brazil shifted from being the second largest cacao exporter to being a cacao importer. World chocolate production could fall dramatically if this disease, which has devastated South and Central American crops over the past 20 years, were to spread to some of the world's other cacao-producing regions.<sup>3</sup>

*Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of Witches' Broom disease, is a basidiomycete with a hemibiotrophic life cycle.<sup>4,5</sup> Initially, mononucleated basidiospores, dispersed by the wind and rain at night, germinate on rapidly growing tissues, such as meristems and young pods, initiating the biotrophic phase of the disease. When emerging branches are infected, the disease is characterized by an impressive growth of new shoots (green broom), which probably acts as a nutritional sink.<sup>5,6</sup> Eight to twelve weeks after the initial infection, the tissues begin to senesce and are colonized inter- and

**Received:** August 9, 2011

**Revised:** October 13, 2011

intracellularly by the saprotrophic mycelia of *M. pernicioso*. The transition from biotrophic to necrotrophic involves changes not only in the plant but also in the biology of the vegetative mycelia.<sup>7–9</sup> The senescing brooms turn brown, forming the typical necrotic dry broom structures of this disease, which remain attached to the plant. After a dry period of 3–9 months, the brooms produce basidiocarps that release spores into the air and reinitiate the disease cycle.<sup>5</sup> Infected plants produce fewer and lower-quality fruits, compromising the amount of cocoa beans produced.<sup>1</sup>

In recent years, efforts have been made toward understanding the infection process at a molecular level and its correlation with the fungus life cycle.<sup>3</sup> Genomic-scale studies have identified key components resulting from the *M. pernicioso*–cacao interaction. Among them, five DNA sequences encoding putative copies of proteins in the fungus that are similar to the necrosis- and ethylene-inducing peptide 1 (NEP1)-like proteins (NLPs) were identified and have been termed MpNEP1–5.<sup>10,11</sup> NLPs are proposed to perform dual functions in the plant–pathogen interactions, acting both as triggers of immune responses and as toxin-like virulence factors known to promote leaf necrosis.<sup>12</sup> The family contains members from the genomes of more than 50 organisms, including fungi, oomycetes, and bacteria, with either saprotrophic or hemibiotrophic lifestyles.<sup>13</sup> Members of the NLP family share a high degree of sequence similarity, containing a secretory signal sequence, a conserved seven-amino acid motif (GHRHDWE), and two or four conserved cysteine residues. The proteins from this family induce a hypersensitive-like death response in a variety of dicotyledonous plants but not in any known monocotyledonous plants.<sup>14</sup>

Here, we provide evidence that MpNEP2 is strongly expressed during the necrotic stage of the fungus infection. To understand the molecular mechanism of action of MpNEP2, we determined its crystallographic structure at 1.8 Å resolution. The crystal structure data combined with the results of site-directed mutagenesis experiments and functional assays highlighted the importance of the conserved seven-amino acid motif (GHRHDWE) and an unforeseen hydrophobic loop in the necrotic process, offering the basis for the design of compounds with the potential to inhibit the protein. Moreover, to test MpNEP2's potential role as a lipid-binding protein, we performed electron paramagnetic resonance (EPR) studies of four different headgroup and acyl chain spin probe phospholipid vesicles added to MpNEP2, as well as tryptophan fluorescence measurements of MpNEP2 added to equivalent nonlabeled vesicles. The results indicated no change in the EPR spectra of the tested lipids and no significant shift in the tryptophan intensity or wavelength emission peak when the protein was added to the vesicles described above, raising the possibility that, if the protein interacts with the cell membrane to perform its necrotic activity, it likely requires some other anchoring element.

## ■ EXPERIMENTAL PROCEDURES

**RNA-seq and Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR).** *T. cacao* var. Comum was cultivated in a greenhouse under controlled temperature and humidity conditions (from 22 to 28 °C and >50%, respectively). Two-month-old seedlings were then infected with *M. pernicioso* spores as described previously.<sup>15</sup> RNA-seq libraries that were produced as part of the WBD Transcriptome Atlas were inspected for the expression of NLP genes during the *in planta*

development of *M. pernicioso*, from the green broom to the dry broom stage (where the plant is virtually consumed by the fungus). The RNA-seq methodology will be described elsewhere (P. L. Teixeira, manuscript in preparation). For the qPCR assays, plant material was collected at five different stages of the disease progression, as follows: no symptoms (10 DAI), first symptoms (swelling, 20 DAI), mature green broom (green broom, 30 DAI), first necrosis symptoms (initial necrosis, 60 DAI), and advanced necrosis (100 DAI). RNA extraction was performed as described by Azevedo and colleagues with minor modifications;<sup>16</sup> the cDNA was synthesized using a SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen), and real-time PCR was conducted according to the Delta-Delta-CT method<sup>17</sup> using primers F-AAGGCAAGACTGCTCTGGTCTA and R-CTTCCTTCCATCGTCTCTCGT and the tubulin gene for endogenous housekeeping.

**Heterologous MpNEP2 Production.** We constructed a truncated form of MpNEP2 (GenBank accession number EF114673.1) that had its secretion signaling peptide deleted (residues Met1–Ala17). This construct (hereafter termed MpNEP2) was cloned into a modified version of the pETSUMO plasmid (Invitrogen), which contains a histidine tag at its N-terminus, and was used to transform *Escherichia coli* Origami 2 cells (Merck). The cells were lysed, and the clarified soluble fraction was purified by a two-step procedure starting with immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) using a Co<sup>2+</sup>-charged TALON resin (BD Biosciences) pre-equilibrated with 30 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM imidazole, 0.3 mM TCEP [tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride], and 1 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride). The resin was washed extensively with this solution and then incubated overnight at room temperature with an appropriate amount of protease ULP-1 for His-SUMO tag removal. The cleaved protein was eluted from the resin and loaded onto a HiLoad Superdex 75 16/60 gel filtration column (GE Healthcare) pre-equilibrated in 30 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 50 mM NaCl. The eluted protein was concentrated to 19 mg/mL as judged by its UV<sub>280</sub> absorption and calculated coefficient extinction<sup>18</sup> and used for crystallization screens and functional assays. Mutants were obtained with the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) by following the manufacturer's instructions and purified according to the protocol developed for the wild-type protein.

**X-ray Crystallography.** The crystallization experiments were performed at 18 °C using the conventional sitting drop vapor diffusion technique. The drops were made by mixing equal parts of protein and well solution, the latter containing 100 mM sodium acetate (pH 5.0), 20% PEG 6000, and 200 mM ZnCl<sub>2</sub>. Before data collection at cryogenic temperatures, the harvested crystals were cryoprotected with 5% ethylene glycol added to the mother liquor. A substantially complete X-ray diffraction data set for MpNEP2 was obtained with beamline D03B-MX1 at the Brazilian National Synchrotron Laboratory at a wavelength of 1.608 Å.

**Phasing and Refinement.** The X-ray diffraction data were processed using Mosflm<sup>19</sup> and merged and scaled with SCALA.<sup>20</sup> The first set of phases was obtained by the molecular replacement technique as implemented in Phaser,<sup>21</sup> using the *Pythium aphanidermatum* NEP<sub>py3</sub> monomer (deposited as Protein Data Bank entry 3gnz<sup>22</sup>) as the search model. Following molecular replacement, a density modification was performed using Parrot, which is part of the CCP4 suite,<sup>23,24</sup> and the improved map was then subjected to an automated

interpretation with the ARPwARP routine.<sup>25</sup> The positional and *B* factor refinement cycles were performed with Refmac.<sup>26</sup> The manual building of the extra portions and real space refinement, including a Fourier electron density map inspection, were performed with Coot.<sup>27</sup> The solvent water molecules, which were treated as oxygen atoms, were added using the appropriate Coot routine. FFT, part of the CCP4 suite,<sup>24,28</sup> was used to calculate the Fourier anomalous electron density map. The overall stereochemical quality of the final model and the agreement between the model and the experimental data were assessed with Molprobity<sup>29</sup> and the appropriate Coot routines.

**Circular Dichroism.** MpNEP2 (6  $\mu$ M, wild type and mutants) was dialyzed against 4 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2), and when required, EDTA (62.5  $\mu$ M) or both EDTA (62.5  $\mu$ M) and CaCl<sub>2</sub> with ZnCl<sub>2</sub> (120  $\mu$ M) were added. The samples were analyzed by far-UV CD spectroscopy (190–260 nm) with a resolution of 1 nm using a JASCO J810 spectropolarimeter. Each data point was generated by averaging 10 accumulations. The secondary structure was estimated on a DICHROWEB interface<sup>30</sup> using the CDSSTR method<sup>30</sup> and Reference Protein Set 4. The mean residue molar ellipticity at 218 nm (MRE [ $\theta$ ]<sub>218</sub>) was also collected at temperatures ranging from 20 to 60 °C at intervals of 1 °C. The apparent melting temperature ( $T_{\text{Mapp}}$ ), which is the temperature at which the molar ellipticity is between the folded and unfolded states, was used to estimate the stability of the wild-type and mutant protein. The data were analyzed using Origin (OriginLab Corp.) for a sigmoidal fit and an inflection point calculation ( $T_{\text{Mapp}}$ ).

**Dynamic Light Scattering.** A DynaPro MSTC014 (Protein Solutions Inc., Lakewood, NJ) dynamic light scattering instrument was used to monitor the oligomeric state of MpNEP2 at concentrations between 220 and 260  $\mu$ M in 4 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) in the absence or presence of either EDTA, CaCl<sub>2</sub>, or ZnCl<sub>2</sub> (1 mM). The assays were performed at 20 °C with an acquisition time of 5–8 s using a 70  $\mu$ L cuvette and 50–100% laser power. Three hundred acquisitions were obtained in a single measurement, and a PBS solution was used for the calculation of the hydrodynamic radii ( $R_{\text{H}}$ ) by DYNAMICS version 6.1 (Protein Solutions Inc.). The theoretical  $R_{\text{H}}$  value for the monomeric protein was calculated by HYDROPRO<sup>31</sup> using the crystallographic model.

**Infiltration of Purified MpNEP2 into Tobacco Leaves.** The control solutions, wild-type MpNEP2 and mutants diluted to 500 nM in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2), were injected into leaves of *Nicotiana tabacum* var. Petite Havana (4–6 weeks old) as described previously.<sup>11</sup> The infiltration of MpNEP2 in BAPTA-containing buffer (10 mM), a specific calcium ion chelator, was preceded by the infiltration of the same leaves with 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) and 10 mM BAPTA. The formation of lesions was documented 5 days after the infiltration of MpNEP2.

**Electrolyte Leakage Assay.** The electrolyte leakage assay was conducted according to the method of Ottmann and colleagues<sup>22</sup> with modifications. The control solutions, containing purified wild-type or mutant MpNEP2, were injected into tobacco leaves as described above. The infiltrated area was immediately removed, cut into pieces of approximately 0.25 cm<sup>2</sup>, and washed with distilled water. After 30 min, the pieces were transferred to fresh Milli-Q water (20 per replica in triplicate), and the intracellular content leakage was measured

with a conductivity meter (WTW LF 330, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH) at different time points.

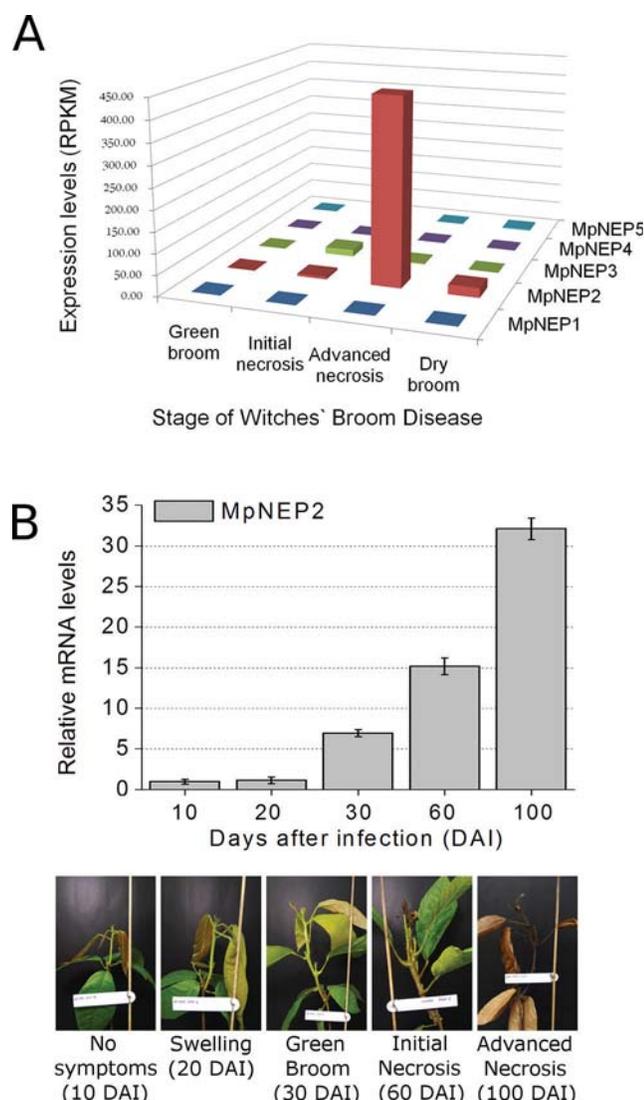
**Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy.** The phospholipids 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho(1'-*rac*-glycerol) (POPG), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (POPS), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), L- $\alpha$ -phosphatidylcholine from egg yolk (egg PC), and the EPR probes 1-palmitoyl-2-stearoyl(16-doxyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (16-PC) and 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho(tempo)choline (DPPTC) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). These lipids were chosen because of their high natural abundance in cell membranes.<sup>32,33</sup> The multilamellar liposomes were prepared by drying appropriate amounts of chloroform stock solutions of DOPC, DOPC and POPG (2:1 molar ratio), DOPC and POPS (2:1 molar ratio) and egg PC and DOPE (2:1 molar ratio) under a stream of N<sub>2</sub>. The EPR spin probes were mixed with the DOPC, DOPC/POPG, DOPC/POPS, and egg PC/DOPE chloroformic solutions to give a final concentration of 0.5 mol %. The samples remained under vacuum for 2 h for the removal of the residual solvent, and the dried lipid film was resuspended at a total lipid concentration of 23.8 mM in 4 mM sodium phosphate (pH 7.2). The large unilamellar vesicles (LUVs) were prepared by extruding the multilamellar liposomes with a two-syringe extruder (Avanti Polar Lipids) equipped with two stacked polycarbonate filters with pores with an average diameter of 100 nm (Nucleopore). The continuous wave (CW) EPR spectroscopy experiments were conducted at room temperature (22  $\pm$  1 °C) on a Varian E109 spectrometer operating at X-band. A measured amount of the buffered MpNEP2 solution was added to the suspension of LUVs and incubated for 10 min at room temperature. A final volume of 40  $\mu$ L of the samples containing MpNEP2/DOPC/spin-label (DPPTC or 16-PC), MpNEP2/DOPC/POPG/spin-label (DPPTC or 16-PC), MpNEP2/DOPC/POPS/spin-label (DPPTC or 16-PC), or MpNEP2/egg PC/DOPE/spin-label (DPPTC or 16-PC) mixtures was drawn into a capillary tube, which was placed in the EPR resonant cavity. Control samples consisted of an LUV suspension without MpNEP2. The final enzyme concentration was 119  $\mu$ M, and the protein:lipid molar ratio was 1:100. The acquisition conditions were as follows: modulation amplitude, 1.0 G; modulation frequency, 100 kHz; microwave power, 10 mW; field range, 160 G.

**Intrinsic Fluorescence Measurements.** The fluorescence measurements were recorded on a plate reader spectrofluorimeter (EnVision, Perkin-Elmer) using a 96-well all-black-walled Eppendorf plate and the default configurations of the equipment at 25.5 °C. The intrinsic fluorescence emission spectra of 2  $\mu$ M MpNEP2 in 4 mM sodium phosphate (pH 7.2) were recorded from 310 to 500 nm after excitation at 295 nm to obtain the fluorescence spectra derived only from the tryptophan residues. The background intensities were always subtracted. Changes in the intrinsic fluorescence of MpNEP2 were also measured upon the addition of 200  $\mu$ M of the following extruded LUVs: DOPC, DOPC/POPG (2:1 molar ratio), DOPC/POPS (2:1 molar ratio), and DOPC/DOPE (2:1 molar ratio).

## RESULTS

**The Level of MpNEP2 Expression Reaches Its Highest Point at the Necrotic Stage of the Disease.** *M. perniciosa* has five copies of NLP genes in its genome.<sup>10,11</sup> An inspection

of RNA-seq libraries that were produced as part of the WBD Transcriptome Atlas (P. L. Teixeira, manuscript in preparation) revealed that only MpNEP2 was significantly expressed during an *in planta* experiment, in which cacao plants were infected with *M. perniciosa*, and samples were collected at different stages of the disease (Figure 1A). Moreover, results of a



**Figure 1.** RNA-seq and real-time PCR analysis of MpNEP2 expression during Witches' Broom disease. (A) The RNA samples extracted from the green broom to the dry broom stages of WBD were sequenced and revealed that MpNEP2 is the major NLP found during the development of the disease (NCBI reference numbers EF109894 for MpNEP1, EF114673.1 for MpNEP2, EF164925 for MpNEP3, JN545833 for MpNEP4, and JN545834 for MpNEP5). (B) Real-time PCR confirmed a positive correlation between increasing levels of MpNEP2 and the appearance of necrotic symptoms. The disease stages, illustrated in the bottom panel, were classified as follows: no symptoms (10 DAI), beginning of swelling branches (20 DAI), mature green broom (30 DAI), beginning of necrosis in leaves (60 DAI), and advanced necrosis in branches (100 DAI). The dry broom stage is not shown. RPKM means reads per kilobase of exon model per 1 million mapped reads.

quantitative real-time PCR assay confirmed that the level of MpNEP2 expression increased along with the extent of the necrosis symptoms, reaching its peak at the advanced necrotic

stage when the dry broom symptoms were noticeable (Figure 1B, bottom panel). These results are consistent with the previously described activity of NLP proteins<sup>14</sup> and suggest that MpNEP2 may be the major isoform involved in the necrosis of cacao during the Witches' Broom disease. On the basis of these findings, this protein was selected for additional structural analyses.

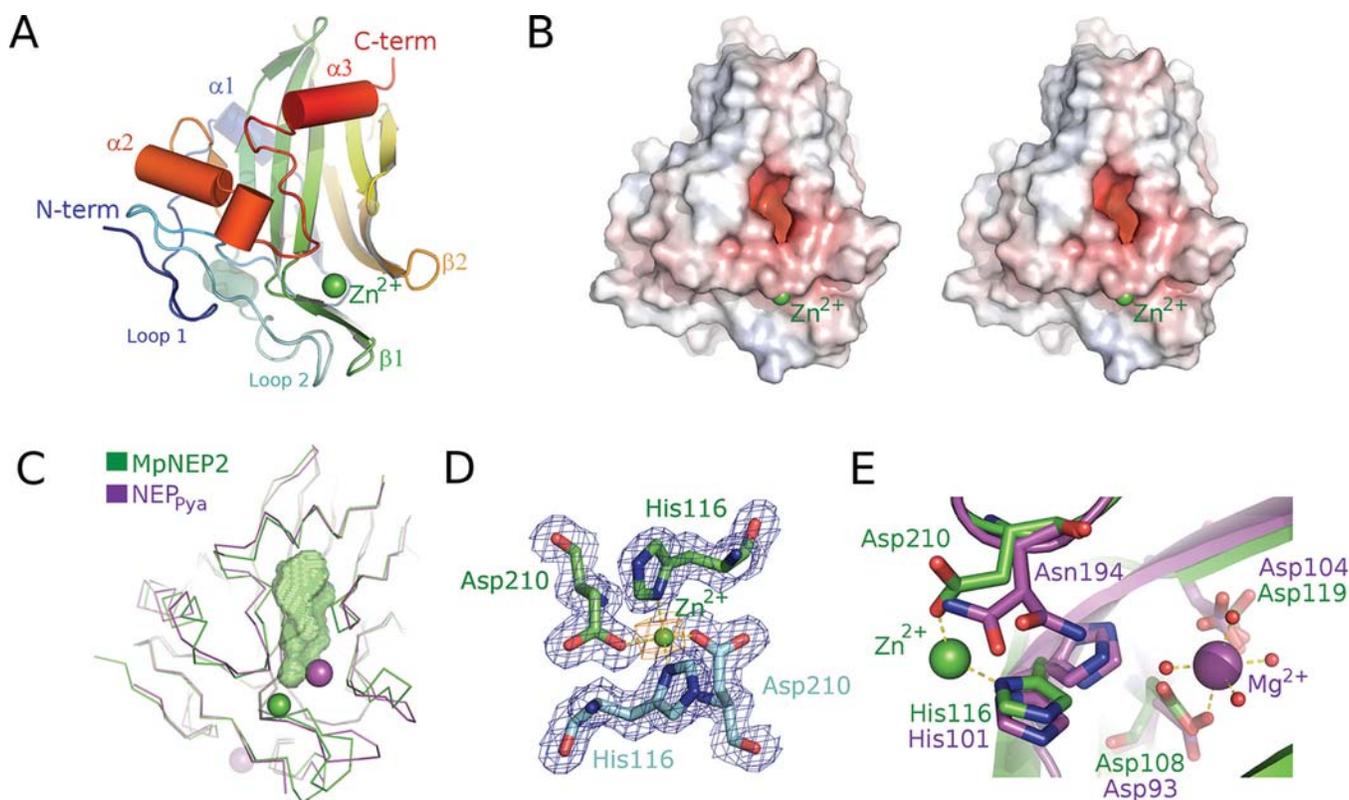
**MpNEP2 Crystal Structure.** Because we were interested in obtaining an improved understanding on the structural determinants of MpNEP2's mode of action, we determined the crystal structure of MpNEP2 at 1.8 Å resolution. The statistics of the final model are listed in Table 1. According to the

**Table 1. Parameters and Statistics of Diffraction Data and Refinement<sup>a</sup>**

	Data Collection
beamline	D03B-MX1 at LNLS
wavelength (Å)	1.608
space group	C121
unit cell dimensions	$a = 89.48 \text{ Å}$ , $b = 44.21 \text{ Å}$ , $c = 60.17 \text{ Å}$ , $\beta = 110.04^\circ$
no. of monomers per asymmetric unit	1
resolution range (Å)	14.52–1.8 (1.9–1.8)
no. of unique reflections	19327 (2522)
average multiplicity	5.1 (3.7)
completeness (%)	93.9 (84.2)
$R_{\text{sym}}$ (%)	0.049 (0.170)
$\langle I \rangle / \sigma(I)$	24.7 (7.9)
solvent content (%)	50.69
Refinement Statistics and Model Quality	
resolution range (Å)	20–1.8
total no. of reflections used	18298
no. of reflections for $R_{\text{free}}$ calculation	1006 (5.2%)
$R_f$ (%) / $R_{\text{free}}$ (%)	14.22/19.57
no. of non-H atoms	1945
no. of residues	212
no. of waters	358
average B factor/rmsd (Å)	
main chain	12.6/0.8
side chain	13.56/1.78
solvent	26.16
rmsd from ideal bond length (Å)	0.021
rmsd from ideal angle (deg)	1.924
Ramachandran plot	
most favored region (%)	96.65
additional allowed region (%)	1.91
generously allowed region (%)	1.44

<sup>a</sup>The numbers in parentheses refer to the highest-resolution shell.

Conserved Domain Database,<sup>34</sup> the structure belongs to the NPPI-like necrosis-inducing protein family. The overall architecture of the monomer in the asymmetric unit reveals a single-domain molecule with a fold consisting of a central  $\beta$ -sandwich, with three parallel strands in the first sheet and a five-stranded antiparallel sheet. Three  $\alpha$ -helices ( $\alpha 1$ – $\alpha 3$ ) surround the second sheet, giving rise to a flat surface. Two large loops (loops 1 and 2) compose the other half of the polypeptide. The formation of an intramolecular disulfide bridge between two conserved cysteine residues within loop 2 (Figure S1 of the Supporting Information), reported to be essential for NLP



**Figure 2.** Crystal structure of MpNEP2. (A) Cartoon representation of MpNEP2 with a rainbow coloring scheme from blue (N-terminus) to red (C-terminus) and a text indication of its structural features, including the presence of a zinc ion (green sphere). (B) Stereoview of the electrostatic potential surface mapping calculated by APBS.<sup>32</sup> The color scale that varies from blue to red represents a variation from positive to negative potential, respectively ( $\pm 12k_b T_c e^{-1}$ ). This panel shows the presence of a very negatively charged cavity and its relative position to the zinc ion. (C) Ribbon representation of the structural superposition of MpNEP2 and NLP<sub>Pya</sub> (green and purple ribbons, respectively), indicating both the high level of structural identity and distinct positions of the cations in the two models (zinc represented as a green sphere and magnesium represented as a purple sphere). The anionic cavity of MpNEP2 is represented as a green surface. (D) Fourier electron density map,  $2F_o - F_c$  (blue mesh), for the residues coordinating to the zinc ion (green sphere), from both symmetry mates, represented as green and cyan sticks. The Fourier anomalous map (orange mesh), at  $3\sigma$  level, contours the ion. (E) Specifics of the cation coordination in the crystallographic models. Whereas magnesium (purple sphere) is found inside the anionic cavity and is coordinated by Asp93 and Asp104, in the crystal structure of NLP<sub>Pya</sub><sup>22</sup> (represented as purple sticks), zinc (green sphere) is coordinated by His116 and Asp210 at the external surface of MpNEP2 (represented as green sticks).

activity,<sup>14</sup> appears to be crucial in stabilizing this loop closer to the  $\beta$ -sheet core of the protein. We can also identify the presence of two small  $3_{10}$ -helices and two adjacent  $\beta$ -hairpins ( $\beta 1$  and  $\beta 2$ ). The structural features are illustrated in Figure 2A.

Electrostatic surface mapping, using APBS,<sup>35</sup> shows the presence of a strong negatively charged cavity (Figure 2B,C) formed among the five-stranded  $\beta$ -sheet, the loop between helices  $\alpha 2$  and  $\alpha 3$ , and hairpin  $\beta 1$ . A strand composed of the conserved sequence “GHRHDWE” defines the bottom of the cavity, which has a volume of  $350 \text{ \AA}^3$  (Figure 2C), as determined by the 3V server.<sup>36</sup> The negative potential is a contribution of the acidic side chains of Asp108, Asp119, and Glu121 and the main chain carboxyl groups of His118 and Trp120.

We observe a very strong peak, surrounding this cavity, in the Fourier  $2F_o - F_c$  electron density map ( $>10\sigma$  in height), which, with respect to its contribution to the dispersive component of the scattering factor, was interpreted as a zinc ion (Figure S1 of the Supporting Information). This ion sits in a 2-fold center of symmetry in the crystal and is coordinated by the side chains of His116 and Asp210 from both the asymmetric unit monomer and its symmetry-related mate (Figure 2D). According to the PISA server,<sup>37</sup> there is an increase in free energy of  $-24.3 \text{ kcal/mol}$  upon ion coordination; however, the resulting protein–

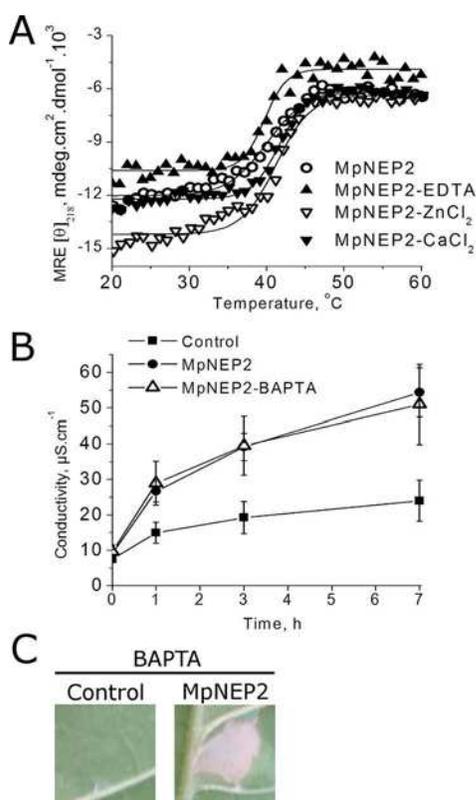
protein interface is energetically less favored ( $0.9 \text{ kcal/mol}$ , with a buried interface area of  $580 \text{ \AA}^2$ ). A second ion was also modeled on the opposite side of the protein surface, and using the same criteria for the determination of the zinc ion, it was interpreted to be sodium (Figure S1 of the Supporting Information). This cation is coordinated by the side chains of Asp157 and His53, the latter belonging to a symmetry-related monomer. Both zinc and sodium ions are present in the protein solution used for the crystallization at concentrations of  $200 \text{ mM}$  ( $\text{ZnCl}_2$ ) and  $50 \text{ mM}$  ( $\text{NaCl}$ ), respectively.

**MpNEP2 Activity Is Not Ion-Dependent.** Ottmann and co-workers<sup>22</sup> showed that the coordination of a divalent cation was crucial to NLP<sub>Pya</sub> cytolytic activity. In this case, a magnesium ion was found inside the boundaries of a negatively charged cavity in the NLP<sub>Pya</sub> structure, being coordinated directly by Asp93 and Asp104 (numbering according to NLP<sub>Pya</sub>'s reference sequence) and four water molecules (Figure 2E). The overall MpNEP2 structure has a fold that is very similar to that of NLP<sub>Pya</sub> (core rmsd of  $1.08 \text{ \AA}$ ), according to Lsqkab,<sup>38</sup> with the major difference between the two structures being the location of their divalent cation, as shown in Figure 2C. Nevertheless, Ottmann and co-workers presented evidence that  $\text{Mg}^{2+}$  was likely not a physiological ligand, and  $\text{Ca}^{2+}$  might actually be relevant for protein activity because BAPTA, a  $\text{Ca}^{2+}$ -

specific scavenger, abolished the plasma membrane disintegrating activity of the NLPs.<sup>22</sup>

Having found a divalent cation in our crystal structure, although it has a different coordination pattern (Figure 2E), we set out to investigate what effect, if any, ions like zinc and calcium would have on the thermal stability and oligomeric state of MpNEP2 and if MpNEP2's necrotic activity is also dependent on calcium.

We first investigated the protein fold stability by determining its melting point using circular dichroism. Neither the presence of zinc nor the presence of calcium significantly altered the apparent melting temperature of MpNEP2 ( $T_{\text{Mapp}}$  for MpNEP2-ZnCl<sub>2</sub> = 41.2 °C, and  $T_{\text{Mapp}}$  for MpNEP2-CaCl<sub>2</sub> = 41.6 °C) relative to the thermal melting point measured in the absence of added divalent cations ( $T_{\text{Mapp}}$  for MpNEP2 = 39.9 °C) (Figure 3A). The thermal melting point was also obtained



**Figure 3.** Structural stability, leakage, and necrosis promoting activity of ion-depleted MpNEP2 or MpNEP2 incubated with CaCl<sub>2</sub> or ZnCl<sub>2</sub>. (A) Circular dichroism (CD) of MpNEP2, ion-depleted MpNEP2 (MpNEP2-EDTA), or MpNEP2 incubated with CaCl<sub>2</sub> or ZnCl<sub>2</sub> at  $\lambda = 218$  nm measured over a range of temperatures. CD data (millidegrees) were converted to mean residue ellipticity units (MRE, millidegrees square centimeters per decimole) and plotted vs temperature. A sigmoidal curve was fitted, and the inflection point was calculated ( $T_{\text{Mapp}}$ ), showing that ion binding does not influence protein stability and implying no structural role for the binding of the ion. (B) A vehicle solution with BAPTA, a specific Ca<sup>2+</sup> chelator (Control), and vehicle solution with MpNEP2 (MpNEP2) or MpNEP2 and BAPTA (MpNEP2-BAPTA) was injected into tobacco leaves, and the electrolyte leakage was measured via solution conductivity. (C) A vehicle solution with BAPTA (Control) or a vehicle solution with MpNEP2 and BAPTA (MpNEP2) was injected into tobacco leaves, and the results were documented after 5 days. The data in panel B are the average values from three experiments  $\pm$  SD, whereas the images in panel C are representative of three experiments.

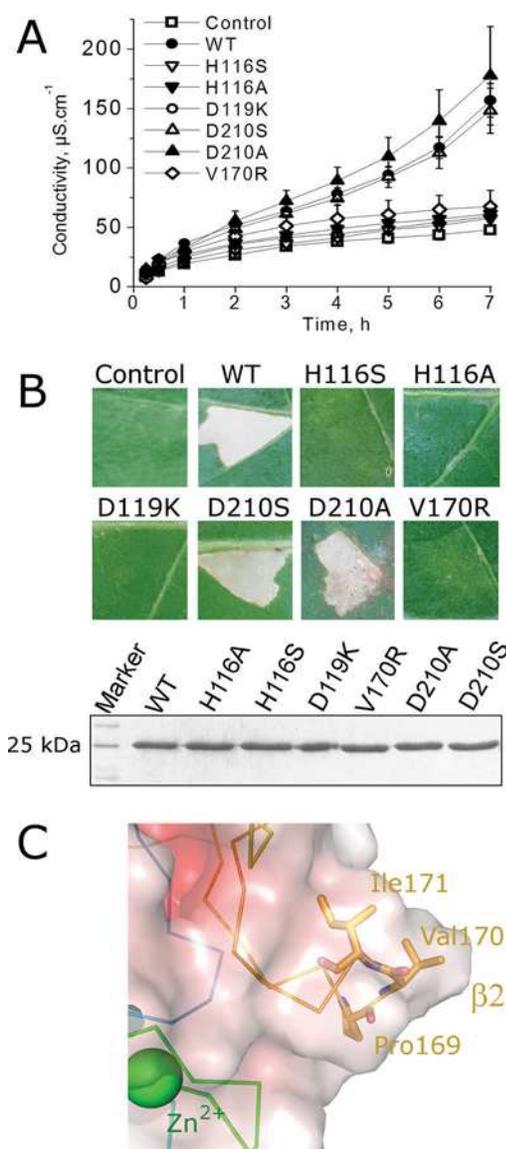
for MpNEP2 in the presence of EDTA to chelate any vestigial ions from the protein purification solutions ( $T_{\text{Mapp}}$  for MpNEP2-EDTA = 39.7 °C). The very similar apparent midpoints of the curves suggested that the presence of the tested cations did not affect the protein's conformational stability.

Next, on the basis of the observations that zinc sits in a 2-fold symmetry center in our crystal structure and, consequently, that an MpNEP2 dimer can be generated by the crystal symmetry operations, we investigated what effects the ions mentioned above would have on the oligomeric state of the protein. Again, little to no change was observed in the hydrodynamic radii ( $R_{\text{H}}$ ) measured for the protein either in the absence (2.2 nm, peak polydispersion of 4.4%) or in the presence of the cations (CaCl<sub>2</sub>, 2.3 nm, peak polydispersion of 11%; ZnCl<sub>2</sub>, 2.4 nm, peak polydispersion of 8.4%) and the chelating agent EDTA (2.3 nm, peak polydispersion of 10%). The calculated  $R_{\text{H}}$  value of the monomer, as determined by HYDROPRO using the monomer present in the asymmetric unit of our crystal, was 2.4 nm, leading us to conclude that, under the tested conditions, MpNEP2 is a monomer. The zinc-coordinated symmetric dimer in the crystal is therefore a packing artifact.

Finally, to check if the necrotic wound and electrolyte leakage promoting activities of MpNEP2 were dependent on calcium, the protein was injected into tobacco leaves both in the presence and in the absence of the calcium scavenger BAPTA. An electrolyte leakage assay was performed with leaves that were freshly treated with 10 mM BAPTA added to MpNEP2, and the results, when compared to the results of the same assay performed with MpNEP2 alone, indicated that this infiltration had no effect on the conductivity detected, as shown graphically in Figure 3B. These observations are supported by the images in Figure 3C, which show the detection of necrosis in leaves treated with MpNEP2 and 10 mM BAPTA but not when BAPTA was injected alone (control), clearly indicating that the addition of BAPTA to the vehicle solution did not perturb MpNEP2 activity.

**Point Mutations Reveal Important Residues for MpNEP2 Activity.** A comparison of the NLP primary sequences found in public databases revealed a strong conservation of a central heptapeptide motif, GHRHDWE,<sup>14</sup> which in MpNEP2 spans residues 115–121. Structurally, this peptide region comprises the bottom of the negatively charged cavity described in the previous section. The importance of this sequence for protein function has already been explored for NLP<sub>Pya</sub> for which the authors showed that substitution of either His101 or Asp104 (numbered according to its reference sequence) with alanine substantially abrogates its biological activity.<sup>22</sup> These His and Asp residues are two of the three residues that coordinate the divalent cation in Protein Data Bank entry 3gnz (Figure 2E), being His101 coordination via a water molecule. In the context of MpNEP2, only His116 (equivalent to His101 in NLP<sub>Pya</sub>) coordinates the zinc ion.

We replaced His116 with either alanine (H116A) or serine (H116S) and Asp119 with a lysine (D119K), where both of these residues are from the conserved seven-residue sequence. The results revealed that all mutations of His116 and Asp119 in MpNEP2 disrupted the protein's ability to promote electrolyte leakage (Figure 4A) and necrotic wounds on tobacco leaves (Figure 4B). The mutation of the Asp119 residue to a lysine likely disturbed the negative potential of the cavity described above (Figure 2B), whereas changing the His116 to either a short nonpolar residue (alanine) or a negative polar residue



**Figure 4.** Mutation of residues from the acidic cavity and a hydrophobic loop disrupts MpNEP2 activity. (A) The vehicle solution (Control) or the vehicle solution containing wild-type (WT) MpNEP2 or mutant H116S, H116A, D119K, D210S, D210A, or V170R was injected into tobacco leaves, and the electrolyte leakage was measured by the solution conductivity for 7 h. (B) Additionally, the necrosis promoting activities on tobacco leaves were observed after 5 days. The bottom panel shows a Coomassie-stained SDS-PAGE gel that contained 50  $\mu\text{g}$  of WT and mutant MpNEP2. The data in panel A are average values from three experiments  $\pm$  SD, and the images in panel B are representative of three experiments. (C) Electrostatic potential surface representation of MpNEP2  $\beta$ -hairpin  $\beta$ 2 ( $\pm 12k_B T_{\text{ce}}^{-1}$ ), highlighting the hydrophobic  $\beta$ -turn composed of Pro169, Val170, and Ile171. The replacement of Val170 with an arginine residue disrupted protein activity.

(serine) has the potential to interfere with in vivo metal coordination, as found in our structure. To further test the importance of this coordination for protein activity, we replaced the other metal-coordinating residue, namely Asp210, with either alanine or serine. None of these mutations resulted in impaired protein activity (Figure 4A,B), implying that a cation is indeed dispensable for MpNEP2 activity, and H116 might exert its influence via a different mechanism. A circular

dichroism analysis of melting temperatures of all mutant proteins assayed here revealed no notably altered tertiary structures within the mutant proteins, suggesting that the observed differences in the biological activities result from changes in the nearby vicinity of the altered residues (Figure S2 of the Supporting Information).

Finally, Kufner and co-workers hypothesized that the membrane attachment of NLP<sub>pya</sub> could be driven by a hydrophobic keel-like structure consisting of Trp155, Pro156, and Leu157 (according to their reference sequence), which would penetrate into the lipid core of the membrane like the hydrophobic regions of actinoporins and perfringolysin.<sup>12</sup> The equivalent residues in MpNEP2 are Pro169, Val170, and Ile171, respectively, which are structurally located at the turn of hairpin  $\beta$ 2 (Figure 4C). To test this hypothesis, we replaced the apical residue in the turn, Val170, with an arginine. As shown in panels A and B of Figure 4, V170R MpNEP2 is impaired in its electrolyte leakage and necrosis promoting activities. To test MpNEP2's lipid binding capability, we performed EPR experiments with spin-labeled lipid vesicles and protein intrinsic fluorescence assays. The EPR spectra of the headgroup spin probe (DPPTC) or the acyl chain-labeled form (16-PC) incorporated into DOPC, DOPC/POPG (2:1 molar ratio), DOPC/POPS (2:1 molar ratio), or egg PC/DOPE (2:1 molar ratio) LUVs in the presence or absence of MpNEP2 showed no changes in their profile at a 1:100 protein:LUV molar ratio (Figure S3A of the Supporting Information). Similarly, the intrinsic fluorescence measurements of MpNEP2 indicated no significant perturbation in the tryptophan emission spectra after addition of a 100-fold molar excess of DOPC, DOPC/POPG, DOPC/POPS, or DOPC/DOPE unlabeled LUVs (Figure S3B of the Supporting Information).

## DISCUSSION

Following the genome<sup>10</sup> and RNA sequencing analyses (Figure 1A) of *M. perniciosa*, five copies of NLPs were described, but only MpNEP2 was expressed during the cacao's Witches' Broom disease. A similar situation was described for *Phytophthora sojae* and *Phytophthora ramorum*, in which only a few of the more than 50 described genes are actually expressed during the diseases these organisms cause (stem and root rot of soybean and Sudden Oak Death, respectively).<sup>14,39</sup> The level of expression of MpNEP2 increases along with the necrotic symptoms, reaching its highest level during full necrosis just before the dry broom stage (Figure 1B). The transcripts encoding the necrosis-inducing protein of *P. sojae* (PsojNIP) reached their highest level after the transition of the fungus from the biotrophic to the necrotrophic stage in soybean plants,<sup>40</sup> whereas in *Mycosphaerella graminicola*, an NLP is expressed moments before necrosis symptoms occur.<sup>41</sup> The presence of more than one NEP-encoding gene in the studied genomes agrees with several evolutionary theories that have recently been grouped into a novel model, the "adaptive radiation model".<sup>42</sup> The other copies of the NEP-encoding gene are likely to be the result of recent duplications, having acquired different roles or become pseudogenes.

The founding member of the now-called NLP (NEP1-like protein) family was NEP1 (necrosis- and ethylene-inducing protein 1), which belongs to the organism *Fusarium oxysporum*.<sup>43</sup> The exact mode of action of NLPs during infection and virulence is not yet completely understood. The crystal structure of a NLP family member from the oomycete *Phytophthora aphanidermatum* (NLP<sub>pya</sub>) has recently been described,<sup>22</sup> and it

was shown to resemble actinoporins, which are pore-forming toxins from marine invertebrates. The authors of this previous study concluded that NLPs are conserved virulence factors that cause plasma membrane permeabilization and cytolysis in plant cells with a mechanism that is dependent on the coordination of an ion, presumably calcium. As suggested,  $\text{Ca}^{2+}$  may mediate the docking of NLPs to target membranes, or it might, alternatively, be required for the membrane permeabilizing activity. Because plants seem to be capable of sensing the cellular changes induced by membrane damage, such as the release of host-derived endogenous elicitors or changes in ion homeostasis, NLPs probably trigger plant immunity-associated defenses through their interference with plant tissue integrity.<sup>22</sup> This idea would explain why so many authors had detected a defense response activity in hosts after they were challenged with NLPs.<sup>13,14</sup> The majority of genes that responded to NLPs are associated with general stress responses, which are calcium-dependent, and are actively expressed by plant host cells.<sup>13,14</sup>

Here, we described the crystal structure and mutational and functional studies of another member of the NLP family, MpNEP2, which is found in the causal agent of cacao's Witches' Broom disease, the fungus *M. perniciosa*. This disease is a serious concern to the South and Central American cacao crops, and an effective combat strategy has yet to be described. Like NLP<sub>Pya</sub> and all the members of the NLP family, MpNEP2 has a conserved heptapeptide motif, GHRHDWE, which is shown to be part of a highly acidic groove (Figure 2B). In NLP<sub>Pya</sub>, the residues from this motif coordinate an ion, likely  $\text{Ca}^{2+}$ , which was shown to be essential for protein activity. Although the crystal structure of MpNEP2 also included a cation in the vicinity of the acidic cavity, here we show that this protein does not depend on a cation for the promotion of its necrotic activity. The protein incubated with EDTA was as stable as the protein after the addition of either  $\text{ZnCl}_2$  or  $\text{CaCl}_2$  (Figure 3A), as measured by circular dichroism over a range of temperatures, indicating no structure-stabilizing function for these ions in MpNEP2. The wild-type calcium-depleted protein, as well as the Asp210A mutant in which one of the two ion-coordinating residues is replaced, behaved equally well in promoting tissue necrosis and electrolyte leakage when injected into tobacco leaves (Figures 3B,C and 4A,B). On the other hand, the mutation of the other ion-coordinating residue, His116, to either a serine or alanine did disrupt MpNEP2 activity, implying that His116 might be important for MpNEP2 necrotic activity via an alternative mechanism. The mutation of the Asp119 residue within the conserved heptapeptide to a nonpolar or oppositely charged residue disrupted protein activity (Figure 4A,B), reinforcing the importance of the negatively charged cavity for protein function.

The MpNEP2 structure is highly similar to the NLP<sub>Pya</sub> structure (rmsd of 1.08 Å for  $\text{C}\alpha$  atoms). The latter<sup>22</sup> presented a fold highly conserved among the cytolitic actinoporins, especially the actinoporins produced by the sea anemones *Actinia equina* (equinatoxin II) and *Stichodactyla helianthus* (sticholysin II). Sticholysin II is a single-domain protein composed of a tightly folded core of  $\beta$ -sheet strands and two short  $\alpha$ -helices, A and B, one on each side of the  $\beta$ -sandwich<sup>44</sup> (Figure S4A of the Supporting Information). The two-dimensional sticholysin II–lipid crystal data led to the proposal that the first 30 residues at the N-terminus, which encompass the amphiphilic  $\alpha$ -helix A, are displaced from the body of the molecule upon binding of the lipid to be able to interact with the C-terminus of a neighboring molecule and

form a tetramer.<sup>44</sup> The structural and functional data showed that the first contact of the molecule with the lipid membrane is promoted by the region around an exposed aromatic patch of the molecule, which contains tryptophan and tyrosine residues. The side chains of Trp110 and Trp114, which point downward and upward, respectively, with respect to the aromatic cluster, are exposed and very likely involved in the association of this protein region with lipid membranes<sup>44</sup> (Figure S4A of the Supporting Information) because the equivalent residues on equinatoxin II contribute to the fluorescence shifts observed upon lipid binding.<sup>44,45</sup> The crystal structure of sticholysin II complexed with phosphocholine revealed that the phospholipid headgroup binding site is placed exactly at this tryptophan and tyrosine rich segment<sup>44</sup> (Figure S4A of the Supporting Information).

In this work, we provide evidence that, remarkably, mutation of Val170 to an arginine residue abrogated protein necrosis and electrolyte activity, revealing that the triad consisting of Pro169, Val170, and Ile171 might, indeed, be a hydrophobic  $\beta$ -hairpin loop involved in membrane disruption. The aromatic patch described above for sticholysin II does not correlate structurally with the  $\beta$ -hairpin loop in MpNEP2 described here, which has a valine [Val170 (see Figure 4C)] that is important for protein activity (Figure 4A,B) (rmsd of 2.38 Å for  $\text{C}\alpha$  atoms upon superimposition of only the  $\beta$ -sheet core). Alternatively, this aromatic region fits within a region on MpNEP2 that has two tryptophan residues exposed to the solvent [Trp228 and Trp230 (Figure S4B of the Supporting Information)]. A possible scenario is that this segment of the protein, along with the hydrophobic  $\beta$ -hairpin loop [both are on the same side of the protein (see Figure S4B of the Supporting Information)], might be involved in the protein–lipid interaction. Moreover, to have a truly porin-like activity, in addition to being able to bind lipids, MpNEP2 must overcome its water-soluble conformation and transform into a lipophilic molecule. This transformation, induced by a lipid surface, would involve tertiary conformational changes. A deeper analysis of the MpNEP2 structural packing revealed that loop 2, as well as  $\alpha$ -helix 2 and adjacent loops (Figure S4B of the Supporting Information), packs against the  $\beta$ -sheet core via aromatic stacking between several residues (Figure S4B of the Supporting Information, top right inset). A potential lipid-induced conformational change could displace this part of the protein to expose a lipophilic surface that was previously hidden.

However, EPR or intrinsic protein fluorescence studies conducted in the presence of LUVs containing phospholipids representative of the most common lipids found in plant cell membranes<sup>32</sup> showed no change in the spectra of the labeled lipids upon addition of MpNEP2 or protein tryptophan fluorescence after the incubation with the LUVs, respectively. Although we did not perform an exhaustive search of all types of lipids and their different combinations, these findings suggest that, if MpNEP2 anchors to the membrane to perform its necrotic activity, it likely requires an interaction with another membrane element, which could be either a specific membrane receptor or glycolipoprotein microdomains.<sup>46,47</sup> This finding could offer an explanation of how MpNEP2, as well as others NLPs, differentiates between dicotyledonous and monocotyledonous plants.<sup>14</sup>

During the progression of Witches' Broom disease, the fungal population inside the host becomes larger, and the concentration of molecules involved in quorum sensing signals also

increases. A phase change synchronization happens at this point of the disease, and MpNEP2 expression could be a benefit to *M. perniciosa* by releasing nutrients from lysed plant cells and by promoting an increase in the space that would allow the fungi's saprotrophic hyphae to quickly proliferate. The highly acidic cavity described for MpNEP2 and the hydrophobic Pro-Val-Ile loop are promising regions for compound screening and design because both of these regions have been shown to be essential for MpNEP2 necrosis promoting activity.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### 📄 Supporting Information

Anomalous X-ray scattering data used to define the nature of the metals found in the structure (Figure S1), apparent melting temperatures measured by circular dichroism, as well as the CD profile at different wavelengths, of all of the mutants described in this paper (Figure S2), EPR and intrinsic fluorescence data in the presence and absence of LUVs (Figure S3), and structural comparisons between the actinoporin sticholysin II and MpNEP2 (Figure S4). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

### Accession Codes

The atomic coordinates and diffraction data have been deposited in the Protein Data Bank as entry 3st1.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: [sandra.dias@lnbio.org.br](mailto:sandra.dias@lnbio.org.br). Telephone: +55 19 3512 3503. Fax: +55 19 3512 1004.

### Funding

This work was supported by FAPESP Grants 2010/51884-8 and 2009/50119-9 and Fellowships 2008/50995-0 and 2010/51891-4.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the Spectroscopy and Calorimetry and the Robolab facilities at LNBio for technical assistance, as well as the staff of the D03B-MX1 beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory. We give special thanks to Dr. Alessandra Girasole for the laboratory technical support.

## ■ ABBREVIATIONS

rmsd, root-mean-square deviation; NLPs, NEP1-like proteins; DAI, days after inoculation of *T. cacao* with *M. perniciosa* spores; SD, standard deviation; WBD, Witches' Broom disease.

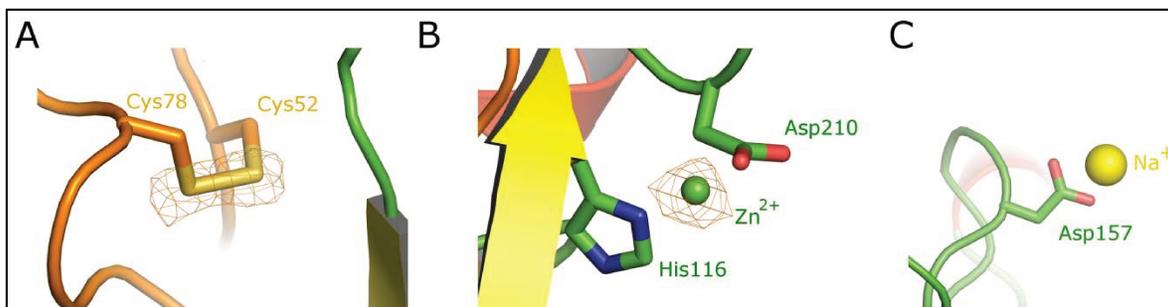
## ■ REFERENCES

- Griffith, G. W., Nicholson, J., Nenner, A., Birch, R. N., and Hedger, J. N. (2003) Witches' brooms and frosty pods: Two major pathogens of cacao. *N. Z. J. Bot.* 41 (3), 423–435.
- Pereira, J. L., Ram, A., Figueredo, J. M., and de Almeida, L. C. (1989) La primera aparición de la "escoba de bruja" en la principal área productora de cacao del Brasil. *Turrialba* 39 (7), 459–461.
- Meinhardt, L. W., Rincones, J., Bailey, B. A., Aime, M. C., Griffith, G. W., Zhang, D., and Pereira, G. A. G. (2008) *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: What's new from this old foe? *Mol. Plant Pathol.* 9 (5), 577–588.
- Aime, M. C., and Phillips-Mora, W. (2005) The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97 (5), 1012–1022.
- Purdy, L. H., and Schmidt, R. A. (1996) Status of cacao witches' broom: Biology, epidemiology, and management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 573–594.
- Scarpari, L. M., Meinhardt, L. W., Mazzafera, P., Pomella, A. W., Schiavinato, M. A., Cascardo, J. C., and Pereira, G. A. (2005) Biochemical changes during the development of witches' broom: The most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. *J. Exp. Bot.* 56 (413), 865–877.
- Delgado, J. C., and Cook, A. A. (1976) Nuclear condition of basidia, basidiospores, and mycelium of *Marasmius pernicius*. *Can. J. Bot.* 54 (1–2), 66–72.
- Evans, H. C. (1980) Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, Causal Agent of Witches Broom Disease of Cocoa. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 74 (6), 515–523.
- Griffith, G. W., and Hedger, J. N. (1994) Dual culture of *Crinipellis perniciosa* and potato callus. *Eur. J. Plant Pathol.* 100 (6), 371–379.
- Mondego, J. M., Carazzolle, M. F., Costa, G. G., Formighieri, E. F., Parizzi, L. P., Rincones, J., Cotomacci, C., Carraro, D. M., Cunha, A. F., Carrer, H., Vidal, R. O., Estrela, R. C., Garcia, O., Thomazella, D. P., de Oliveira, B. V., Pires, A. B., Rio, M. C., Araujo, M. R., de Moraes, M. H., Castro, L. A., Gramacho, K. P., Gonçalves, M. S., Neto, J. P., Neto, A. G., Barbosa, L. V., Guiltinan, M. J., Bailey, B. A., Meinhardt, L. W., Cascardo, J. C., and Pereira, G. A. (2008) A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into witches' broom disease of cacao. *BMC Genomics* 9, 548.
- Garcia, O., Macedo, J. A., Tiburcio, R., Zapparoli, G., Rincones, J., Bittencourt, L. M., Ceita, G. O., Micheli, F., Gesteira, A., Mariano, A. C., Schiavinato, M. A., Medrano, F. J., Meinhardt, L. W., Pereira, G. A., and Cascardo, J. C. (2007) Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. *Mycol. Res.* 111 (4), 443–455.
- Kufner, I., Ottmann, C., Oecking, C., and Nurnberger, T. (2009) Cytolytic toxins as triggers of plant immune response. *Plant Signaling Behav.* 4 (10), 977–979.
- Pemberton, C. L., and Salmond, G. P. (2004) The Nep1-like proteins: A growing family of microbial elicitors of plant necrosis. *Mol. Plant Pathol.* 5, 353–359.
- Gijzen, M., and Nurnberger, T. (2006) Nep1-like proteins from plant pathogens: Recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry* 67, 1800–1807.
- Frias, G. A., Purdy, L. H., and Schmidt, R. A. (1995) An inoculation method for evaluating resistance of cacao to *Crinipellis perniciosa*. *Plant Dis.* 79 (8), 787–791.
- Azevedo, H., Lino-Neto, T., and Tavares, R. M. (2003) An improved method for high-quality RNA isolation from needles of adult maritime pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 21, 333–338.
- Livac, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-DDCT</sup> method. *Methods* 25, 402–408.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., and Bairoch, A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook* (Walker, J. M., Ed.) pp 571–607, Humana Press, Totowa, NJ.
- Leslie, A. G. W. (1992) Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data, *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography*, Vol. 26.
- Evans, P. R. (2005) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D* 62, 72–82.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 40, 658–674.
- Ottmann, C., Lubera, B., Kufner, I., Koch, W., Brunner, F., and Weyand, M. (2009) A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 10359–10364.

- (23) Zhang, K. Y. J., Cowtan, K., and Main, P. (1997) Combining constraints for electron-density modification. *Methods Enzymol.* 277, 53–64.
- (24) Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallogr. D50*, 760–763.
- (25) Perrakis, A., Morris, R. M., and Lamzin, V. S. (1999) Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat. Struct. Biol.* 6, 458–463.
- (26) Vagin, A. A., Steiner, R. S., Lebedev, A. A., Potterton, L., McNicholas, S., Long, F., and Murshudov, G. N. (2004) REFMAC5 dictionary: Organisation of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr. D60*, 2284–2295.
- (27) Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D66*, 486–501.
- (28) Read, R. J., and Schierbeek, A. J. (1988) *J. Appl. Crystallogr.* 21, 490–495.
- (29) Chen, V. B., Arendall, W. B. III, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2010) MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D66*, 12–21.
- (30) Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2008) Protein Secondary Structure Analyses from Circular Dichroism Spectroscopy: Methods and Reference Databases. *Biopolymers* 89, 392–400.
- (31) Ortega, A., Amoros, D., and Garcia de la Torre, J. (2011) Prediction of hydrodynamic and other solution properties of rigid proteins from atomic- and residue-level models. *Biophys. J.* 101, 892–898.
- (32) Welti, R., Li, W., Li, M., Sang, Y., Biesiada, H., Zhou, H. E., Rajashekar, C. B., Williams, T. D., and Wang, X. (2002) Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase *Dα* in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277 (35), 31994.
- (33) Simon, E. W. (1974) Phospholipids and plant membrane permeability. *New Phytol.* 73, 377.
- (34) Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Deweese-Scott, C., Fong, J. H., Geer, L. Y., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Lanczycki, C. J., Lu, F., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Omelchenko, M. V., Robertson, C. L., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C., and Bryant, S. H. (2011) CDD: A Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.* 39, D225–D229.
- (35) Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., and McCammon, J. A. (2001) Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10037–10041.
- (36) Voss, N. R., and Gerstein, M. (2010) 3V: Cavity, channel and cleft volume calculator and extractor. *Nucleic Acids Res.* 38, W555–W562.
- (37) Krissinel, E., and Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* 372, 774–797.
- (38) Kabsch, W. (1976) A solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Crystallogr. A32*, 922–923.
- (39) Bae, H., Bowers, J. H., Tooley, P. W., and Bailey, B. A. (2005) NEP1 orthologs encoding necrosis and ethylene inducing proteins exist as a multigene family in *Phytophthora megakarya*, causal agent of black pod disease on cacao. *Mycol. Res.* 109, 1373–1385.
- (40) Qutob, D., Kamoun, S., and Gijzen, M. (2002) Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. *Plant J.* 32, 361–373.
- (41) Motteram, J., Kufner, I., Deller, S., Brunner, F., Hammond-Kosack, K. E., and Nürnberger, T. (2009) Molecular characterization and functional analysis of MgNLP, the sole NPP1 domain-containing protein, from the fungal wheat leaf pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22, 790–799.
- (42) Francino, M. P. (2005) An adaptive radiation model for the origin of new gene functions. *Nat. Genet.* 37, 573–578.
- (43) Bailey, B. (1995) Purification of a protein from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology* 85, 1250–1255.
- (44) Mancheño, J. M., Martín-Benito, J., Martínez-Ripoll, M., Gavilanes, J. G., and Hermoso, J. A. (2003) Crystal and Electron Microscopy Structures of Sticholysin II Actinoporin Reveal Insights into the Mechanism of Membrane Pore Formation. *Structure* 11, 1319–1328.
- (45) Malovrh, P., Barlic, A., Podlesek, Z., Macek, P., Menestrina, G., and Anderluh, G. (2000) Structure–function studies of tryptophan mutants of equinatoxin II, a sea anemone pore-forming protein. *Biochem. J.* 346, 223–232.
- (46) Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J. P., Hartmann, M. A., Bonneau, M., Simon-Plas, F., Lessire, R., and Bessoule, J. J. (2004) Lipid rafts in higher plant cells: Purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 279 (35), 36277.
- (47) Bhat, R. A., and Panstruga, R. (2005) Lipid rafts in plants. *Planta* 223, 5.

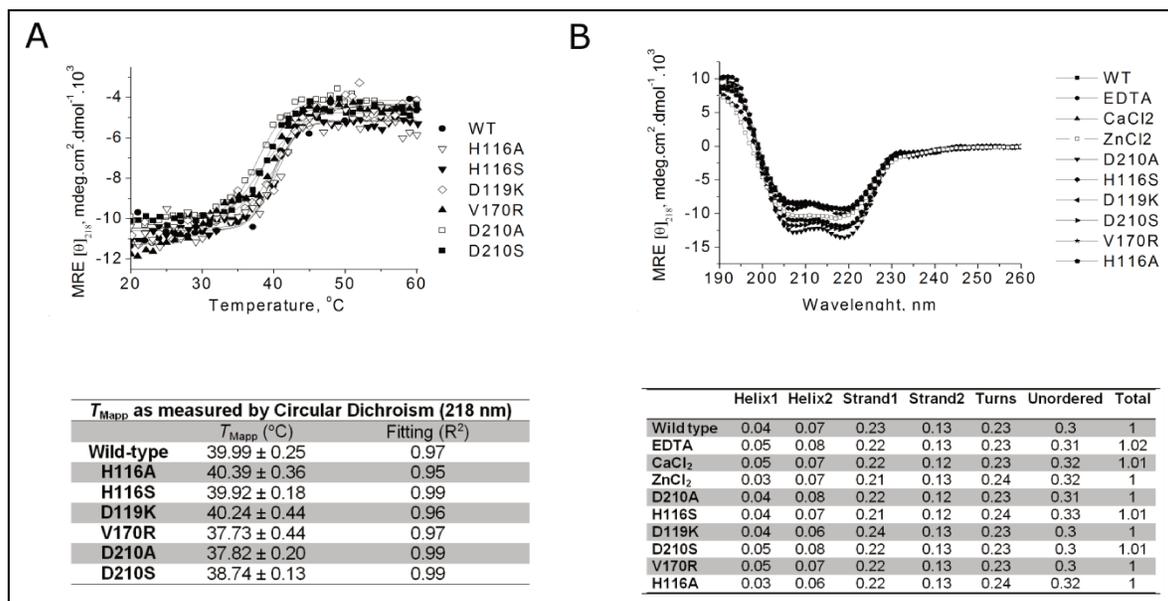
## “Supporting File” referente ao artigo

**Figure S1**



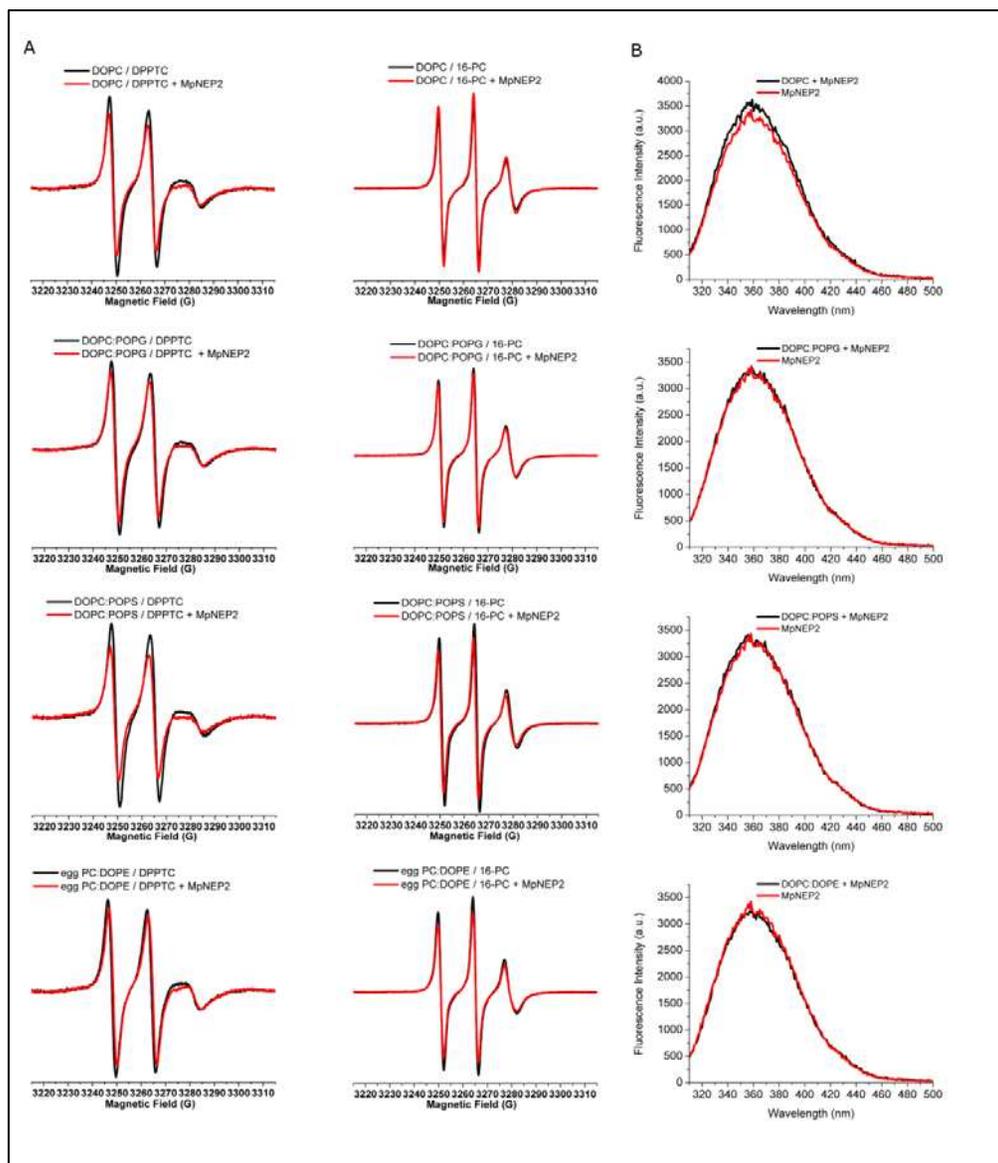
*Figure S1. Identification of binding metals in MpNEP2 crystal structure.* X-ray diffraction data set collected at a wavelength of 1.608 Å presented clear peaks in the Fourier anomalous map contoured at  $3\sigma$  (orange mesh representation). Due to size, shape and chemical environment, they were readily identified as metal ions and, based on the protein purification protocol and crystallization condition, possible candidates were sodium, zinc and cobalt. The contribution of zinc to the  $f''$  component of the atomic scattering factor at the correspondent energy is 0.73 electrons (as calculated by the software CROSSEC (1), which is very similar to the contribution of sulfur (0.60 electrons). As the wavelength used corresponded to the absorption edge of the K-shell of cobalt, the same, if present in the structure, should contribute with 3.9 electrons to the dispersive term of the scattering factor. We used the peaks heights in the Fourier anomalous map at the disulfide bridge as a standard (A) to determine the nature of the metals present in our structure. Only one of the two positions initially identified as metals had similar contour levels to the sulfur peaks and therefore was interpreted as zinc (B). At the site where the other metal should be, no peaks in the anomalous map were found. According to this observation and to the chemical environment, sodium was modeled (C).

**Figure S2**



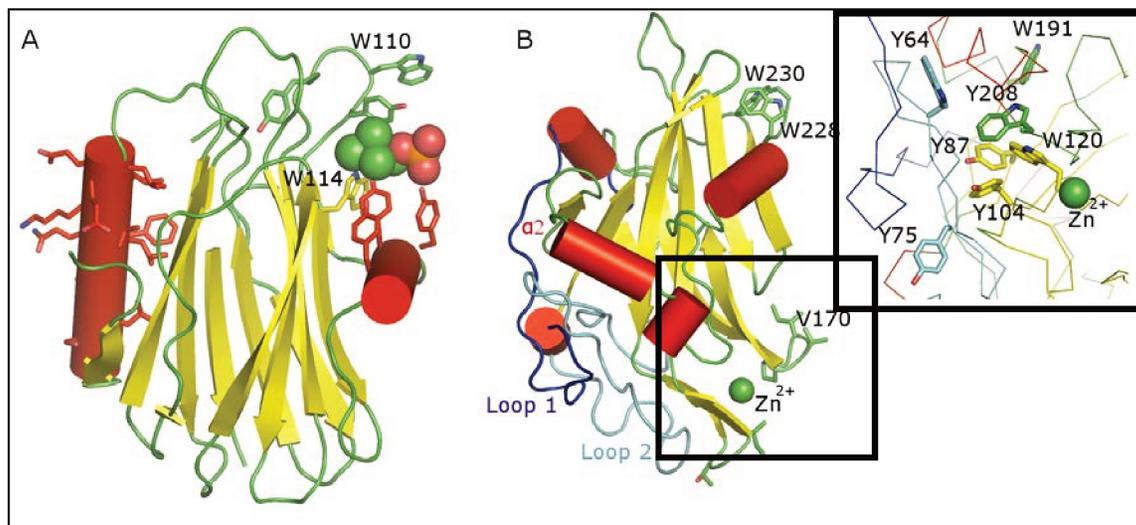
*Figure S2. Thermal stability and conservation of the folding features across the MpNEP2 mutants. (A) The point mutants used in this manuscript were tested for folding stability as inferred from the  $T_{\text{Mapp}}$  calculated from MRE  $[\theta]_{218 \text{ nm}}$ , at a range of temperatures (see table below for the values). (B) Far-UV CD spectrum measurement (190–260 nm) of MpNEP2 wild-type (incubated with EDTA or CaCl<sub>2</sub>/ZnCl<sub>2</sub>) and mutants. Secondary structure was estimated on DICHROWEB interface (2) using CDSSTR method (2) and the Reference Protein Set #4 (table below).*

**Figure S3**



*Figure S3. Electron paramagnetic resonance and intrinsic fluorescence assays. (A) The EPR spectra of the headgroup spin probe (DPPTC – on the left) or the acyl chain-labeled (16-PC – on the right) incorporated into DOPC, DOPC:POPG (2:1 molar ratio), DOPC:POPS (2:1 molar ratio) and egg PC:DOPE (2:1 molar ratio) LUVs in the presence or absence of MpNEP2 showed no changes in their profile at a 1:100 protein:LUV ratio (mol:mol). (B) The intrinsic fluorescence measurements of 2  $\mu$ M MpNEP2 indicated no significant perturbation in the tryptophan emission spectra after addition of a 100-fold molar excess of the DOPC, DOPC:POPG, DOPC:POPS, or DOPC:DOPE non-labeled LUVs.*

**Figure S4**



*Figure S4. Comparison between the actinoporin sticholysin II and MpNEP2 structures.* Sticholysin II (A) and MpNEP2 (B) structures represented as cartoon and colored according to secondary structure ( $\alpha$ -helices in red,  $\beta$ -strands in yellow and loops in green, dark blue and cyan). Sticholysin was co-crystallized with phosphocoline (represented as spheres) (3). Inset figure on the right corner reveals MpNEP2 aromatic residues from the  $\beta$ -sheet core involved on stabilizing loop 2 and  $\alpha$ -helix 2 closely packed to the protein body. Membrane binding could potentially induce the displacement of this loop and helix in order to create a lipophilic surface.

## **Utilização de MpNEP2 em composição de herbicidas com seletividade a plantas dicotiledôneas**

Desde a descrição do primeiro membro das NLPs por Bailey e colaboradores em 1995, foi observada sua capacidade de causar necrose quando aplicada a plantas. Com base nessas observações surgiram diversas tentativas de se utilizar membros dessa família como possível herbicida. Testes foram realizados com *Pleospora papaveracea*, ascomiceto utilizado no biocontrole de plantas de ópio, juntamente com a proteína NEP1 de *F. oxysporum* (Bailey et al., 2000). Uma tentativa de se produzir herbicida utilizando NEP1 também foi realizada com a adição de surfactantes e aspersão do combinado em folhas, originando necrose nas mesmas (Bailey et al., 2000b). Outro estudo semelhante foi realizado adicionando-se NEP1 juntamente com cepas de *Pseudomonas syringae* a diferentes plantas para análise de viabilidade de plântulas (Gronwald et al., 2004). Em ambos os estudos a adição de NEP1 aumentou a área de necrose causada pelas bactérias, comprovando o potencial das NLPs como aditivos a bioherbicidas.

Novos estudos foram realizados com esse mesmo intuito (Alabouvette et al., 2009), entre eles a transformação de linhagens de *Fusarium sp* com o gene NEP1 na tentativa de deixá-las mais virulentas e conseqüentemente mais efetivas no combate às folhas de coca (Meir et al., 2009).

Nosso trabalho gerou um pedido de patente, baseando-se no fato de que as NLPs causam necrose e aumentam o efeito de bioherbicidas. A idéia de nosso pedido de patente é a união de proteínas da família das NLPs com herbicidas químicos conhecidos, como o glifosato para aumentar seus efeitos em plantas dicotiledôneas e torna-lo mais seletivo, uma vez que as NLPs atingem apenas esse tipo de planta. Assim, as NLPs funcionariam como um adjuvante a um composto já existente no mercado. O pedido de patente foi elaborado pela Inova-Unicamp e está depositado sob o número PI0911418-1, com o título “**Composição herbicida seletiva para dicotiledôneas, e método de aplicação da referida composição**”. A folha rosto do pedido de patente está mostrada anexada a seguir.



Espaço reservado para protocolo

**DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO**

**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

**1. Depositante (71):**

1.1 Nome: **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP**

1.2 CNPJ/CPF: **460684250001/33**

1.3 Endereço completo: **CIDADE UNIVERSITÁRIA "ZEFERINO VAZ" - DISTRITO DE BARÃO GERALDO - CAMPINAS - SP**

1.4 CEP: **13083-970**

1.5 Telefone: **(19) 3521.5015**      1.6 Fax: **(19) 3521.5210**

1.7 E-mail: **patentes@inova.unicamp.br**

continua em folha anexa

**2. Natureza:**  Invenção       Modelo de Utilidade       Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: **INVENÇÃO**

**3. Título da Invenção, Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição (54):**

**"COMPOSIÇÃO HERBICIDA SELETIVA PARA DICOTILEDÔNEA, E MÉTODO DE APLICAÇÃO DA REFERIDA COMPOSIÇÃO"**

continua em folha anexa

**4. Pedido de Divisão:** do pedido Nº:      Data de Depósito: **/ /**

**5. Prioridade:**       interna       unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s)

País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito
		/ /
		/ /
		/ /

**6. Inventor (72):**

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: **GUSTAVO HENRIQUE ALCALÁ ZAPAROLI**

6.2 Qualificação: **BRAS,SOLTEIRO,BIÓLOGO**      6.3 CPF: **31205981861**

6.4 Endereço completo: **RUA JOSÉ APARECIDO PAVAN, 650, PARQUE DAS UNIVERSIDADES, EM CAMPINAS - SP**

6.5 CEP: **13086-080**

6.6 Telefone: **(19) 3521.6238**      6.7 Fax: **(19) 3521.6235**

6.8 E-mail: **gustavo@lge.ibi.unicamp.br**

continua em folha anexa

## *M. roreri*

Nosso laboratório conta com a colaboração do USDA no projeto “Comparative genomics analyses of fungal pathogens of cacao”. Contamos, portanto, com dados de sequências de *M. roreri* e disponibilidade de material genético do fungo, fato de extrema importância para o desenvolvimento deste projeto, uma vez que o fungo *M. roreri* não pode entrar no país devido a questões sanitárias de proteção de nossas lavouras cacaueiras. Os experimentos de expressão gênica foram realizados em um mês de intercâmbio no Laboratório SPCL (Sustainable Perennial Crops Lab), do USDA em Beltsville, MD, Estados Unidos.

Análise de sequências em busca de NLPs no genoma de *M. roreri* mostraram a presença de três genes (MrNEP1-3) com alta similaridade de sequência com os genes NEPs de *M. perniciosa* (91% entre MrNEP1 e MpNEP1, por exemplo), denominados MrNEP1 a MrNEP3 de acordo com o grau de semelhança com os genes de *M. perniciosa*.

Da mesma forma que o observado em *M. perniciosa* (Zaparoli et al., 2011), apenas um gene de *M. roreri* mostrou-se significativamente expresso em experimentos de Real-Time PCR. A cópia de maior expressão em *M. roreri* foi a com maior grau de semelhança com MpNEP2, ou seja MrNEP2. Dessa forma podemos inferir que a duplicação dos genes NLPs no gênero *Moniliophthora* provavelmente ocorreu anteriormente à especiação, com as mesmas cópias funcionais, aqui denominadas MpNEP2 e MrNEP2.

Vale lembrar que o fungo *M. roreri* atinge apenas os frutos do cacaueiro e por esse motivo os experimentos de comparação com *M. perniciosa* tiveram que ser feitos com um fruto infectado (utilizando bibliotecas confeccionadas pelo aluno Paulo Teixeira – artigo em preparação).

A figura 8 mostra análise por Real-Time PCR realizado em frutos coletados em fazendas produtoras de cacau no Equador, infectados com Monilíase em diferentes estágios da doença. Os frutos são coletados no Equador, uma vez que nos EUA também não existe Monilíase nas plantações de cacau e é proibido fazer infecção, mesmo em laboratório, de árvores sadias. O material é então enviado ao SPCL através de uma parceria entre o USDA e um órgão do governo equatoriano de prevenção a doenças da agricultura.

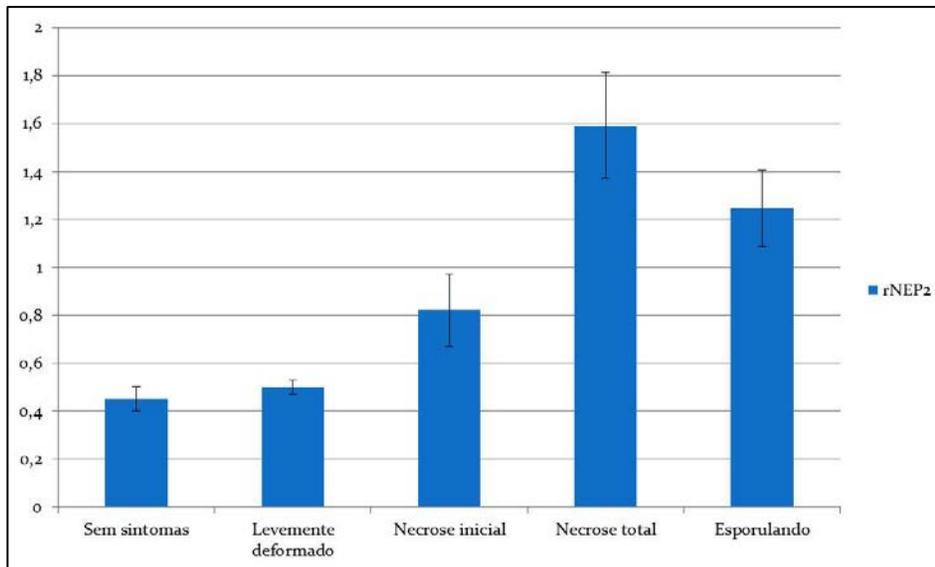


Figura 8 - Estudo de expressão de MrNEP2 em frutos infectados no campo com Monilíase, mostrando a expressão relativa de MrNEP2 em cada estágio da doença em relação à expressão do gene da actina de *M. roseri*

Os frutos foram coletados de acordo com os sintomas visualizados nos frutos durante a doença, que se inicia com a deformação dos mesmos ainda verdes, avançando com o início de necrose na casca e culminando com o total apodrecimento do fruto e consequente formação de esporos na superfície necrosada.

Podemos observar que em *M. roseri* a expressão da NLP acompanha os sintomas de necrose durante o desenrolar da doença, da mesma forma que em *M. perniciosa*, apresentando seu pico máximo durante o sintoma mais severo de necrose da doença.

Outro experimento foi realizado, em laboratório, com a inoculação de *M. roseri* em uma extremidade do fruto de cacau (ponto de inóculo) e coleta de material genético uma semana depois, em dois pontos diferentes: no próprio ponto de inóculo, já com sintomas avançados de necrose e em um ponto distante sem sintomas de necrose detectáveis a olho nu. Desta forma foi possível fazer uma comparação entre este fruto inoculado com Monilíase com duas bibliotecas de RNASeq em momentos das doenças semelhantes em frutos de cacau infectados com Vassoura-de-Bruca.

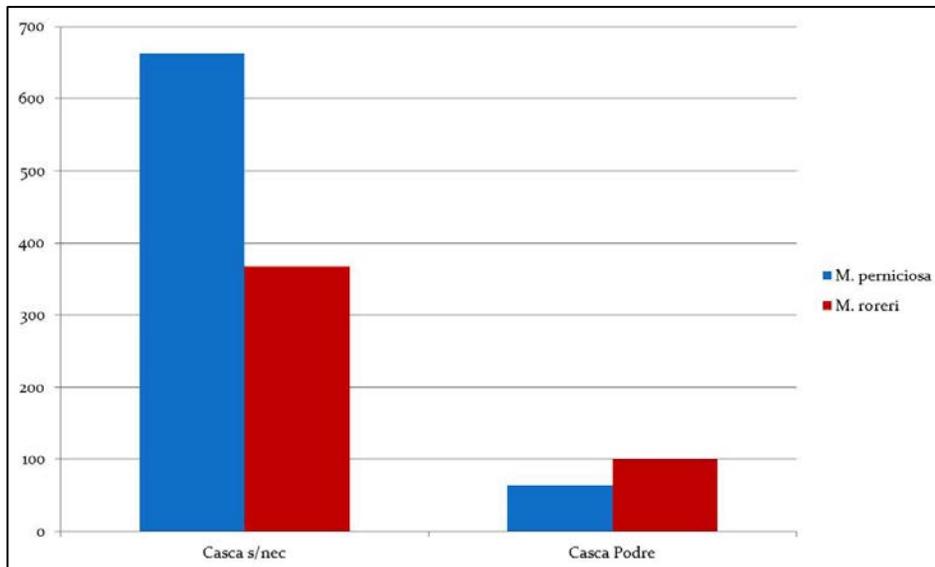


Figura 9 - Análise de expressão comparada dos genes NLPs em frutos de cacau infectados com *M. perniciosa* (MpNEP2 em azul) e *M. royeri* (MrNEP2 em vermelho). O gráfico mostra a expressão de cada gene calculada em relação à expressão dos genes de actina em cada situação e experimento, para cada fungo testado.

Podemos observar a expressão muito maior na casca do fruto sem necrose aparente, que virá ainda a sofrer necrose. Esses resultados corroboram a idéia de que as NLPs são responsáveis pela necrose observada na doença.

No desenrolar da doença em frutos, algumas diferenças são observadas com relação à Vassoura-de-Bruxa nos ramos, principalmente na fase de necrose total. Nos ramos ocorre o secamento e os sintomas característicos de vassoura-seca, enquanto que nos frutos ocorre um apodrecimento tornando o fruto um invólucro de nutrientes disponíveis para o fungo. Por esse motivo, a expressão acentuada das NLPs em regiões do fruto ainda sem necrose faz sentido, corroborando a hipótese de que a necrose a seguir vem do contato das células da planta com as proteínas e sua consequente destruição. Uma vez que o fruto já está podre e os nutrientes disponíveis, a expressão das NLPs diminui.

Pode-se observar a semelhança no padrão de expressão dos genes da família das NLPs, mostrando que a função desta proteína durante ambas as doenças possa realmente estar relacionada com o desenrolar dos sintomas de necrose e apodrecimento dos frutos.

## **CAPÍTULO II – Ceratoplataninas de *Moniliophthora perniciosa* e *Moniliophthora roreri***

Durante um estudo de expressão diferenciada de genes entre as fases de vida de *Moniliophthora perniciosa*, foi encontrada uma sequência com similaridade a outra família descrita como de proteínas indutoras de necrose, as Ceratoplataninas (Pazzagli et al., 1999; Rincones et al., 2008). Cinco cópias foram encontradas no genoma de *M. perniciosa* e foram denominadas MpCPs (Zaparoli et al., 2009).

Após análises da literatura e constatação de que nem todas as CPs causam necrose em plantas (Djonovic et al., 2006; Vargas et al., 2008; Frias et al., 2011) e, mais importante, alguns membros elicitam respostas de defesa e até mesmo SAR (Seidl et al., 2006; Djonovic et al., 2007; Yang et al., 2012), surgiu a segunda parte desse projeto, com o objetivo de analisar a expressão dos genes de defesa em planta após contato com MpCPs, assim como os membros individualmente em busca de sua função na doença Vassoura-de-Bruxa.

### **MATERIAIS E MÉTODO**

#### **Clonagem e expressão das MpCPs de *M. perniciosa***

##### **- Método A**

Inicialmente as clonagens foram realizadas em bactérias *E. coli* da cepa BL21 (DE3) pT-Trx e vetores pet28a. As purificações foram realizadas no LGE, conforme descrito em outros trabalhos (Garcia et al., 2007; Zaparoli et al., 2009).

##### **- Método B**

As clonagens foram realizadas em bactérias *E. coli* da cepa Origami II e vetores pETSUMO (*Small Ubiquitin-like MOdifier*). Para a purificação empregou-se a técnica de *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (IMAC) utilizando-se resina Talon (Clontech) para o isolamento das proteínas produzidas em fusão com a proteína SUMO acrescida de cauda de histidina. Uma vez rompidas as células, o extrato clarificado foi misturado à resina, a mesma foi então lavada com volume adequado de solução e então

submetida à clivagem por 16 horas. Após este período, a resina foi decantada em coluna e o sobrenadante coletado contendo a proteína livre da fusão. A proteína foi então concentrada e aplicada em coluna de filtração em gel HL Superdex 75 16/60 (GE), empregando-se o equipamento Akta-FLPC (GE).

### **Clonagem e expressão de MrCPs de *M. royeri***

O fungo foi crescido em meio contendo extrato de levedura e extrato de frutos de cacau durante 12 dias, e o RNA foi extraído utilizando-se protocolo previamente descrito (Bae et al., 2005). As moléculas de cDNA foram confeccionadas com o auxílio do Superscript VILO Kit (Invitrogen). Reações de PCR foram realizadas com primers específicos para cada um dos genes, desenhados com o auxílio do programa *Primer3*. O gene foi então clonado no vetor pET15 e trazido até o Brasil para a continuidade dos estudos.

### **Testes de atividade**

As plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) utilizadas pertencem à variedade SR1 – Petit Havana e foram crescidas por dois meses na casa de vegetação do LGE. Aproximadamente 50 uL de solução de cada proteína na concentração 0,5 mg/mL foram inoculados com uma seringa hipodérmica de 1 mL próximo à nervura central. Como controle é utilizado o mesmo tampão de Gel Filtração (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl).

### **Análises de expressão das CPs em *Moniliophthora perniciosa***

O material para análise de expressão dos genes das CPs durante a Vassoura-de-Bruxa foi coletado através de um experimento de infecção de plântulas na casa de vegetação do LGE. O RNA foi coletado em diferentes estágios da doença, sendo plântulas sem sintomas, plântulas com o começo do inchaço característico da fase de vassoura-verde, plântulas apresentando início dos sintomas de necrose nas folhas e plântulas com um estágio avançado de necrose. Foi também coletado material de vassouras-secas, mas nenhum material genético foi extraído com sucesso dessa situação, provavelmente por termos escolhido plantas com avançado estágio de necrose e decomposição.

## **Biblioteca de RNA**

O experimento foi realizado pelo aluno de Doutorado Paulo J. Teixeira, enquanto as análises computacionais pelo aluno Osvaldo R. Junior. Os resultados foram analisados utilizando-se o número de *reads* por mil pares de base do gene em estudo por milhão de pares de base da biblioteca analisada (RPKM) (Mortazavi et al., 2008).

NGS1 são esporos coletados de *M. perniciosa*, GE1 são esporos de *M. perniciosa* após germinarem em laboratório em placas com ágar puro. Plântulas de cacau foram infectadas com esporos de *M. perniciosa* em nossa casa de vegetação, e material genético coletado em diferentes momentos da doença, sendo GB1 vassoura-verde, NA4 quando os primeiros sintomas de necrose nas folhas estão aparentes, NB1 quando as folhas estão totalmente necrosadas mas não os ramos e DB1 vassoura-seca.

Frutos de cacau infectados com Vassoura-de-Bruca foram trazidos da Bahia e seu material genético coletado em diferentes estágios de desenvolvimento, assim como suas sementes. GPB1 são sementes de frutos com início de necrose, DBP1 são sementes de um fruto necrosado e BPB1 são sementes de fruto podre. GS3 é a casca de um fruto no início de necrose, DG2 é a região sem necrose de um fruto apodrecido e DR2 é a região podre da casca do mesmo fruto apodrecido. PRD1 é o material genético de um primórdio de basidiomas e BDA4 do próprio basidiomas. Por último, FV2 representa o material genético de um fungo crescido *in vitro*.

## **Expressão de genes de defesa em plantas após contato com as CPs**

Folhas de cacau da casa de vegetação do LGE foram retiradas de plântulas com aproximadamente quatro meses de idade e recortadas em pequenos discos com 2 cm de diâmetro. As folhas foram deixadas em água por meia hora e então cada tratamento foi separado em uma placa de petri com 10 discos separados aleatoriamente. Sob cada um dos discos foi colocada uma gota de 20 uL de proteína ou água destilada com o auxílio de uma pipeta. As proteínas foram utilizadas na concentração de 5 ug/mL e, portanto, foi colocado em contato com cada disco 100 ng de proteína. Cada grupo de 10 discos correspondentes a cada tratamento foi então macerado com nitrogênio líquido e seu RNA extraído.

Os genes escolhidos para a confecção dos *primers* foram baseados nas respostas de defesa características de plantas. São eles ACS (*1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase Gene*, da via de produção de Etileno), GLU (endo-1,3-beta-glucosidase – PR 2), CHI (quitinase – PR 3), PER (peroxidase – PR 9) e PR 1 (como pode ser constatado na Tabela 1). Todos os experimentos foram analisados por Real-Time PCR utilizando-se o gene da subunidade ribossomal 18 de cacau para normalização dos dados.

### **Células de tabaco**

As células foram cedidas pelo laboratório do Professor Dr. Victor Vitorello, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, pertencente ao CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura) da USP-Piracicaba. Os experimentos foram realizados em colaboração com a aluna de doutorado Lucélia Borgo.

As células foram crescidas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), a 28 °C e mantidas sob agitação de 180 rpm no escuro, e repicadas a cada 7 dias em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio. Após quatro dias de repicadas, as células foram transferidas para erlenmeyers com 10 mL de meio. Após 1h da transferência foi adicionado 0,5 uM de proteína a ser testada, e as células foram comparadas com o controle a diferentes intervalos de tempo, de 2 a 48 horas. A verificação da viabilidade celular foi feita com o auxílio do corante FDA (Burdrige et al., 2006) em microscópio de fluorescência.

Para os testes com células de tabaco novos pares de *primers* foram desenhados (PR1a, PR2, PR4, PR5, PR10 e um fator de transcrição da PR1 - NPR1), novamente referentes às proteínas PR e descritos previamente na literatura (Ghanta e Chattopadhyay, 2011).

### **Análises estruturais das MpCPs**

Os pacotes de programas HKL2000 (Otwinowski and Minor 1997) e Mosflm (Leslie 1992)/Scala (Evans 2005) foram utilizados para o processamento dos dados. Uma vez que não havia nenhuma estrutura disponível no PDB com similaridade às CPs, até o momento de análise, conforme busca efetuada no BLAST, para auxílio durante substituição molecular, a resolução da estrutura da MpCP1 foi realizada pelo método de *S-Sad-phasing*.

A técnica de *Sad-phasing* utiliza-se de leituras anômalas para a identificação de átomos pesados, no caso de MpCP1, dois átomos de enxofre que formam uma ponte

dissulfeto foram identificados na forma de “super-sulfur”. A partir daí a molécula é montada *ab-initio* com os dados coletados (Sheldrick, 2007).

Após a resolução da estrutura de MpCP1, as outras três proteínas MpCP2, MpCP3 e MpCP5 foram resolvidas por substituição molecular, usando MpCP1 como molde. Foi então empregado o programa Phaser (McCoy, *et al.* 2007) do pacote CCP4 (Collaborative Computational Project 1994). Para os passos de interpretação dos mapas de densidades eletrônica, construção, refinamento e validação do modelo, os programas Refmac (Vaguin *et al.* 2004), PHENIX e Coot (Emsley *et al.* 2010) foram empregados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise de sequências

Novas análises do genoma de *Moniliophthora perniciosa* identificaram a presença de sete novos genes com sequência similares às CPs, totalizando 12 membros dessa família no genoma. Na figura a seguir observamos uma comparação de sequências entre cinco MpCPs e a Ceratoplatanina de *C. platani*. Apenas cinco CPs estão mostradas nessa análise, pois foram as primeiras identificadas com as análises do genoma de *M. perniciosa* realizadas no LGE. Posteriormente, com análises de sequenciamento de RNA, foram identificadas as outras cópias, totalizando 12 no genoma de *M. perniciosa*.

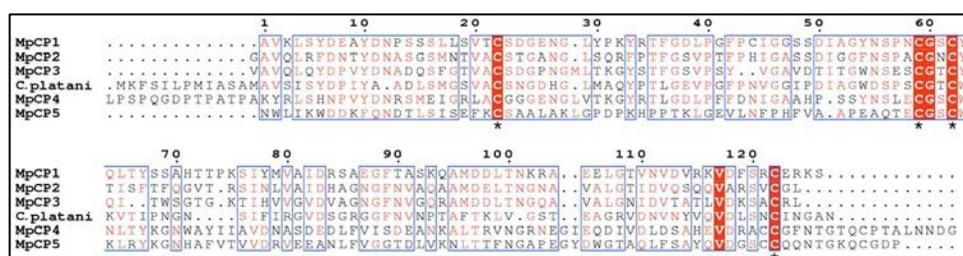


Figura 10 - Análise de sequências entre as cinco primeiras CPs identificadas no genoma de *M. perniciosa*, em comparação com a encontrada em *C. platani* utilizando o programa ClustalW. Em destaque pode-se observar as quatro cisteínas conservadas nas sequencias da família Ceratoplatanina.

A semelhança de sequencias primárias é muito alta nessa família de proteína, e esse é um dos grandes motivos para a manutenção da mesma, mesmo com tantas diferenças de organismos ou mesmo de função observadas entre as cópias.

O genoma de *M. royeri* foi sequenciado pelo SPCL - USDA em colaboração com o nosso laboratório - LGE (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/royeri>). Análises do genoma de *M. royeri* revelaram a presença de duas sequências semelhantes às CPs (denominadas MrCP1 e MrCP2).

A identidade das sequências é alta não somente entre os parálogos de cada fungo (mais de 45% em *M. pernicioso* e 88% em *M. royeri*), mas também entre os genes homólogos de CPs no gênero *Moniliophthora* (83% entre MpCP1 e MrCP1 e 89% entre MpCP2 e MrCP2).

A sequência obtida de MrCP1 apresenta uma região diferente das outras sequências e, quando esta região foi analisada detalhadamente, descobriu-se um íntron (Figura 11, assinalada em vermelho), fato ainda não descrito nessa família de proteínas. Além disso, essa proteína tem a região C-terminal mais curta do que as outras descritas para a família, tendo inclusive perdido a quarta cisteína de sua sequência (assinaladas em azul).

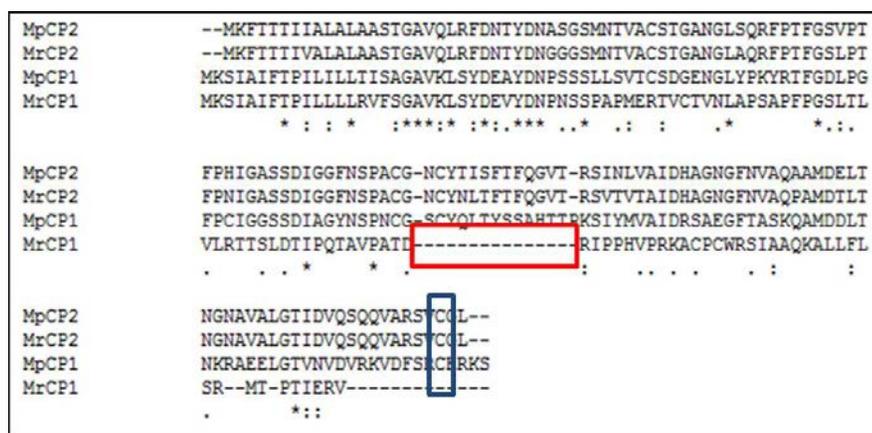


Figura 11 - Análise comparativa entre cópias de CPs entre os fungos *M. pernicioso* e *M. royeri* utilizando-se o programa ClustalW. Em destaque, em vermelho, pode-se observar a região identificada como um íntron na sequência de MrCP1, e em azul, a falta da quarta cisteína na mesma sequência MrCP1, encontrada em todos os membros da família Ceratoplatania

### Clonagem e expressão das MpCPs de *M. pernicioso*

Inicialmente realizamos os experimentos de clonagem e expressão pelo método A, descrito em detalhes na seção Materiais e Métodos ao final desse capítulo. Em 2011 foi iniciada uma colaboração com o grupo dos pesquisadores Dr. Andre Luis Berteli Ambrosio e Dra. Sandra Dias, do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), pertencente ao

Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), em Campinas, especialistas em expressão, purificação e cristalografia de proteínas.

Foi verificado neste contato inicial que os sistemas e condições de expressão, assim como construções de vetores que estavam sendo utilizados, não eram os ideais, uma vez que estavam sendo obtidos baixos rendimentos, proteínas com alto grau de polidispersão e com caudas residuais de vetores desnecessariamente longas (como podemos verificar na figura 12A).

A expressão foi então reavaliada e mudaram-se os insertos correspondentes às proteínas de estudo para vetores pETSUMO (*Small Ubiquitin-like MOdifier*) e para a cepa Origami II de *E. coli*. Este vetor permite construções com pouco ou nenhum resíduo extra após clivagem com ULP-1 (protease usada para clivagem da SUMO), e a cepa Origami II é mais adequada para proteínas que formam ligações dissulfeto, caso das proteínas alvos deste estudo. Este novo método de expressão e purificação foi denominado Método B e está descrito em detalhes na seção Materiais e Métodos desse capítulo.

A expressão de proteínas fusionadas a SUMO aumentou suas solubilidades, além de ter a própria remoção da cauda facilitada pelo uso da protease ULP-1, que possui ação específica sobre seu sítio de clivagem. Desta forma restam menos aminoácidos após a remoção da proteína de fusão no método B em relação ao A (figura 12), facilitando o enovelamento da proteína, assim como estudos de atividade biológica e de cristalografia. Como observado na figura 12B, com essa alteração o grau de pureza das proteínas produzidas foi aumentado.

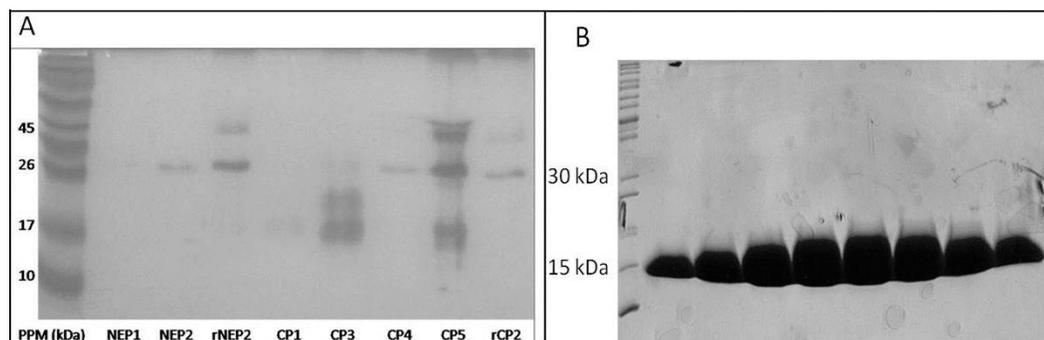


Figura 12 - SDS-PAGE realizado com as proteínas em estudo após purificação pelos diferentes métodos citados. A) Proteínas MpNEP1, MpNEP2, MrNEP2, MpCP1, MpCP3, MpCP4, MpCP5 e MrCP2 purificadas pelo método A descrito na seção Materiais e Métodos, com baixo rendimento e em baixa escala de produção e B) Proteína MpCP1 purificada pelo método B descrito na seção Materiais e Métodos, em maior escala e com uma qualidade e rendimento maior.

Observa-se que a qualidade das purificações feitas anteriormente era muito baixa, além da quantidade de proteína obtida ser menor, devido às limitações de escala encontradas no LGE. Nota-se inclusive a diferença de tamanho citada, enquanto no método A conseguíamos proteínas monoméricas com tamanho entre 17 e 26 kDa, pelo método B conseguimos as proteínas nos mesmos tampões e temperatura sempre no estado monomérico e com tamanhos ao redor de 15 kDa, conforme desejado. Além disso, observados alguns agregados no gel A, provavelmente formados através de ligações inespecíficas intermoleculares.

Conseguimos a expressão dos genes correspondentes e purificação com sucesso e na forma solúvel das proteínas MpCP1, MpCP2, MpCP3 e MpCP5. O gene referente à proteína MpCP4 não pode ser expresso de forma solúvel em nenhuma das condições testadas e, por esse motivo, nos experimentos seguintes foram usadas apenas as quatro proteínas purificadas com sucesso. A figura 13 mostra o sucesso da expressão, com as proteínas ainda ligadas à proteína de fusão SUMO.

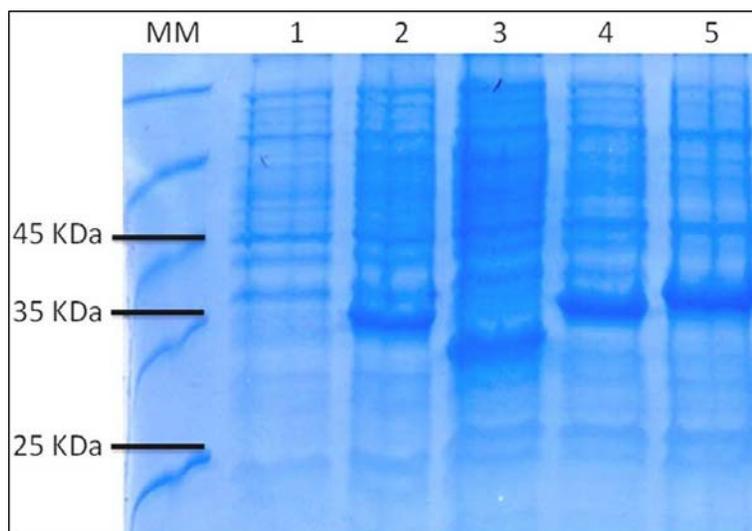


Figura 13 – SDS-PAGE de teste de expressão das proteínas em estudo, mostrando o lisado total da expressão utilizando-se o método B. MN) marcador de peso molecular, 1) cultura controle sem indução, 2) MpCP1, 3) MpCP2, 4) MpCP3 e 5) MpCP5.

### **Clonagem e expressão de MrCPs de *M. royeri***

Conforme citado anteriormente os experimentos com material genético de *M. royeri* foram realizados no SPLC. Como observado anteriormente (Figura 11), a sequência

referente à proteína MrCP1 possui a região C-terminal menor, além da presença de um íntron. Provavelmente devido a isso, não foi possível expressar o gene referente a essa proteína em condições experimentais.

O gene *MrCP2* foi clonado e expresso conforme descrito para as MpCPs (método B), mas não obteve-se a proteína solúvel em nenhum dos vetores ou linhagens de bactérias testadas, apesar da grande identidade de sequência com *MpCP2* (89%).

### Testes de atividade

A fim de investigar e confirmar atividade de necrose das CPs foram utilizadas folhas de tabaco. Testes iniciais com MpCP1 mostraram resposta de necrose localizada em folhas de tabaco (Figura 14) ou mesmo de cacau (Zaparoli et al., 2009). Quando os testes foram refeitos com as proteínas purificadas pelo método B, nenhuma das CPs testadas causou sintomas de necrose em folhas de tabaco.

Apesar de aparentemente ser um dado controverso, algumas hipóteses foram formuladas a fim de tentar explicar essa diferença, sem descartar a hipótese de que com o método A a proteína não estaria totalmente purificada, com contaminações causando a reação de necrose observada.

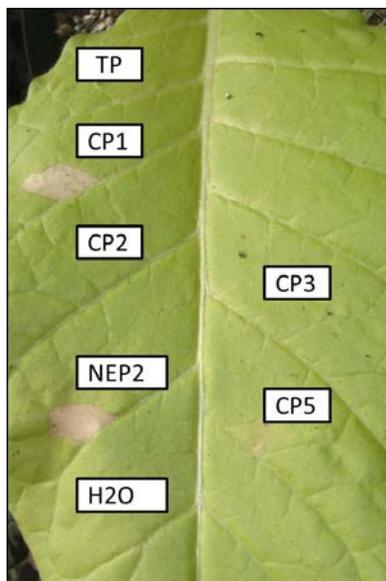


Figura 14 - Testes de atividade com as CPs de *M. pernicioso*, produzidas pelo método A, em folhas de tabaco. MpNEP2 foi utilizada como controle positivo, enquanto tampão (TP) e água como controle negativo.

Uma das hipóteses é a de que com mais etapas durante a purificação, temos selecionado proteínas em apenas um estado oligomérico, sem agregados não estruturais ou com ligações intermoleculares indesejadas, que poderiam estar formadas pelo método A (observadas em alguns casos como podemos ver na figura 12A). Segundo Vargas e colaboradores (2008), Epl1 e Sm1, proteínas da família das CPs, dependem do estado oligomérico para causar necrose nas plantas hospedeiras. Testes de espalhamento molecular foram realizados por DLS com as proteínas purificadas pelo método B e mostram que estão todas em sua forma monomérica.

Uma segunda hipótese é a de que com o método A de expressão e purificação as proteínas estariam com um grau elevado de degradação e, portanto, apenas peptídeos estranhos estariam sendo inoculados nas folhas. O termo “estranho” é usado aqui com o sentido imunológico, ou seja, não próprio. Os peptídeos estariam sendo reconhecidos pela planta como MAMPs, gerando respostas de defesa.

Além disso, apenas dois membros da família CP foram descritos como indutores de necrose (Pazzagli et al., 1999; 2009) enquanto outros não causam necrose (Djonovic et al., 2007; Yang et al., 2012), e ambos os grupos induzem respostas de defesa; apesar da grande semelhança de sequências primária e maior ainda secundária. Alguma pequena modificação de conformação pode ter ocorrido de forma diferente quando o sistema de expressão foi alterado.

### **Análise de toxicidade das proteínas em células de cacau em cultura**

Foram realizados testes com as CPs purificadas, da mesma forma que o citado com a MpNEP2, em culturas de células de cacau e de tabaco (linhagem BY2) analisadas com o corante FDA. Utilizou-se concentrações de proteínas elevadas até 0,5 mg/mL, quantidade maior do que a descrita na literatura para outros membros das CPs que causam necrose em plantas (Pazzagli et al., 2009).

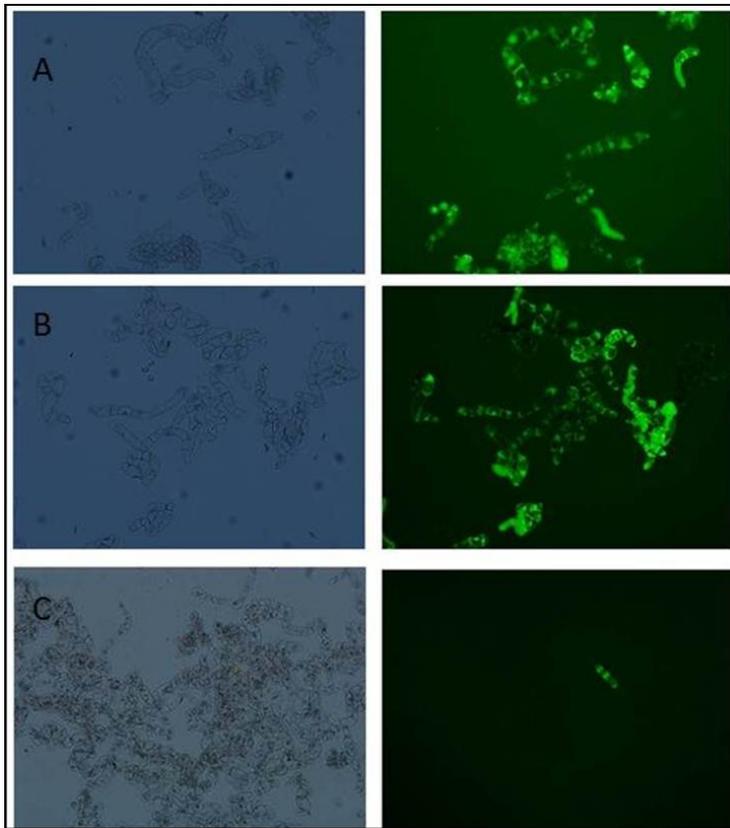


Figura 15 - Viabilidade de células de tabaco após tratamento. A coluna da esquerda mostra as células visualizadas com luz branca normal e a da direita com filtro de luz azul em um microscópio de fluorescência. Células que fluorescem em verde são células vivas. A) Tampão (controle negativo) B) MpCP5 C) MpNEP2 (controle positivo de mortalidade celular)

Em nenhum dos tratamentos, em células de cacau ou de tabaco, foi observada mortalidade celular maior do que as células tratadas apenas com o tampão, através de contagem celular realizada com auxílio de uma Câmara de Neubauer (contagem mínima de 100 células). Além disso, nenhuma alteração ocorreu na coloração do meio de cultura ou na morfologia das células. Podemos observar na figura 15 um exemplo do experimento, com o tratamento de MpCP5 em células de tabaco, utilizando-se MpNEP2 como controle positivo de morte celular.

Este experimento foi realizado com as proteínas purificadas das duas maneiras aqui já mencionadas e em nenhum dos casos apresentou diferenças nas células ou morte celular.

### **Análise de expressão das CPs em *Moniliophthora perniciosa***

A fim de analisar a expressão dos genes de CPs em *M. perniciosa*, realizamos experimentos de Real-Time PCR com material extraído de esporos, fungo na fase necrotrófica crescido em meio Malt e basidiomas. Os experimentos de Real-Time PCR foram normalizados utilizando-se o gene da tubulina do fungo, que acompanha o crescimento do fungo durante a doença (Joan Barau, artigo em preparação).

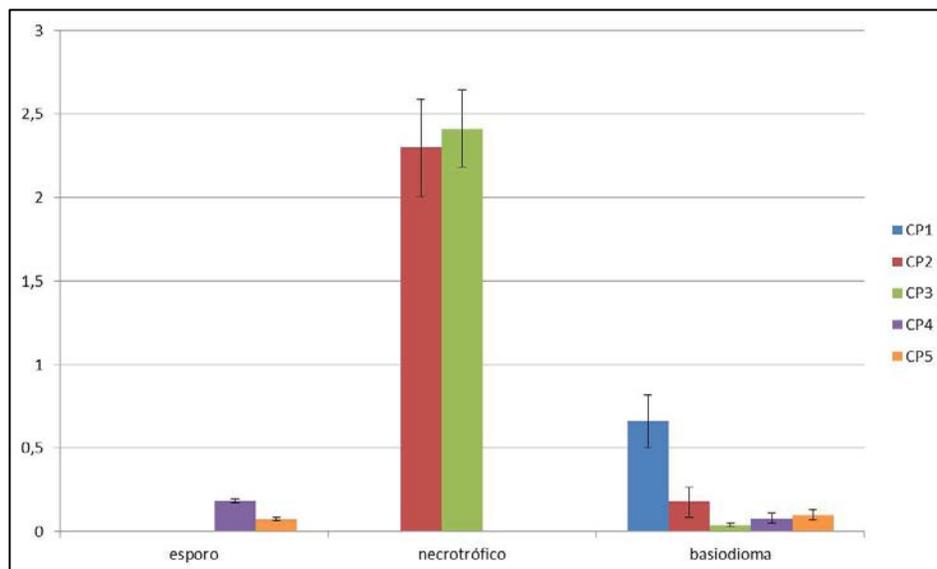


Figura 16 - Análise de Real-Time PCR dos genes CPs em *M. perniciosa* em esporos, fungo necrotrófico e basidiomas *in vitro*. Os dados estão mostrados em relação à expressão do gene da tubulina de *M. perniciosa* nas mesmas situações.

Pode-se observar uma diferença bem marcante entre as cópias nas três condições testadas, sendo que MpCP2 e MpCP3 apresentam os maiores níveis de expressão no fungo crescendo em placa em meio rico de nutrientes, enquanto CP1 apresenta expressão elevada em basidiomas quando comparado com os outros genes. Esporos de *M. perniciosa* possuem uma expressão geral baixa, com MpCP4 e MpCP5.

Observa-se nos resultados da figura 17 que apenas *MpCP4* e *MpCP5* são significativamente expressos durante a interação com a planta, sendo que são expressos de forma muito semelhante ao longo da doença, apenas apresentando um pequeno pico na fase inicial da necrose, que depois diminui com o avanço dos sintomas.

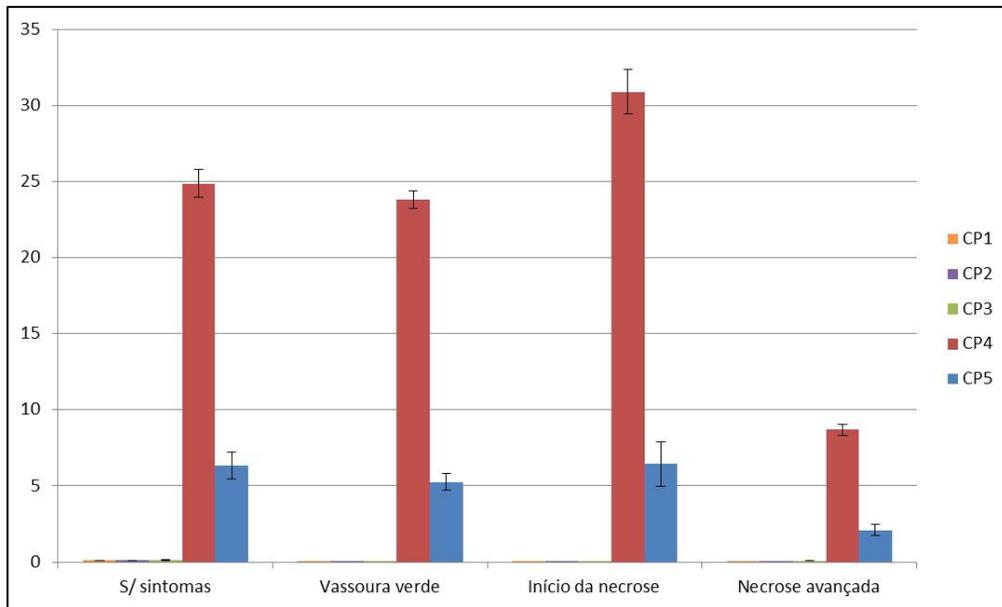


Figura 17 - Análise da expressão dos genes CPs em *M. perniciosa* durante interação com o cacau por Real-time PCR. Os dados estão mostrados em relação à expressão do gene da tubulina de *M. perniciosa* nas mesmas situações.

É interessante observar que *MpCP4* é o gene mais expresso durante a doença, embora tenha sido o único gene não expresso com sucesso de forma heteróloga. Este fato pode estar relacionado com a falta de alguma modificação pós-tradução necessária para seu enovelamento correto, que não estaria ocorrendo em *E. coli*. Foi descrito que as proteínas Epl1 e Sm1 necessitam ser glicosiladas para evitar a formação de dímeros e só assim apresentam atividade nas plantas hospedeiras (Djonovic et al., 2007; Vargas et al., 2008).

Como mencionado previamente, foram realizadas análises do transcriptoma de plântulas e frutos de cacau infectadas com Vassoura-de-Bruca, assim como de esporos e basidiomas de *M. perniciosa* através da técnica de sequenciamento de RNA total (RNASeq) (Wang et al., 2009). As bibliotecas formadas estão detalhadas na seção de Materiais e Métodos.

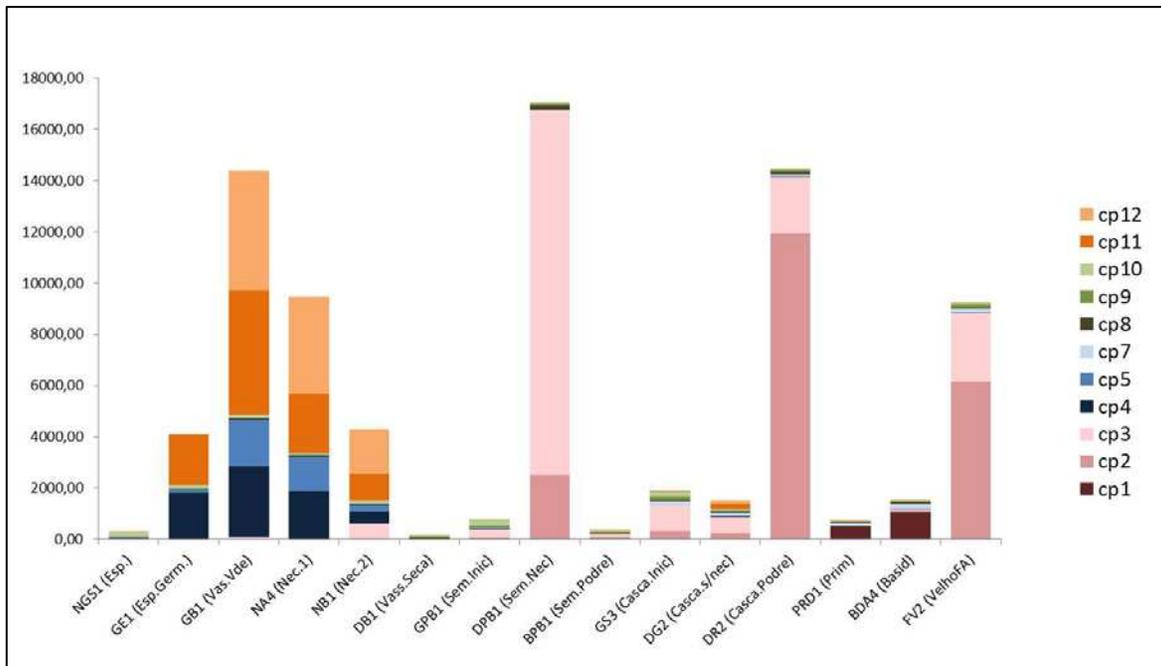


Figura 18 – Análise de expressão das cópias de MpCPs através do método de sequenciamento de RNA. NGS1) esporos, GE1) esporos germinando em placas com ágar puro, GB1) plântulas no estágio de vassoura-verde, NA4) plântulas apresentando os primeiros sintomas de necrose nas folhas, NB1) plântulas com as folhas totalmente necrosadas mas não os ramos, DB1) plântulas no estágio de vassoura-seca, GPB1) sementes de frutos com início de necrose, DBP1) sementes de fruto necrosado, BPP1) sementes de fruto podre, GS3) casca de fruto no início de necrose, DG2) região sem necrose da casca de um fruto apodrecido, DR2) região podre da casca do mesmo fruto apodrecido, PRD1) primórdio de basidiomas, BDA4) basidiomas, FV2) fungo crescido *in vitro*. Cada barra representa uma biblioteca analisada e cada cor representa o número de RPKM para cada cópia analisada.

Pode-se notar que as diferentes cópias agrupam-se quando analisamos o padrão de expressão, e esses grupos evidenciam momentos diferentes da Vassoura-de-Bruxa. Por exemplo, CP12, CP11, CP4 e CP5 são proteínas que apresentam a expressão de seus genes quase que exclusivamente durante a infecção de plântulas de cacau (desde a germinação de esporos até a fase de necrose avançada). A expressão dos genes referentes à CP2 e CP3 quase não é detectada durante a infecção de plântulas, mas é muito elevada em situações que apresentam grande quantidade de nutrientes, como sementes de um fruto necrosado, casca de um fruto podre, além de fungo crescido *in vitro* em meio Malt. O gene referente à CP1 apresenta expressão em um terceiro grupo, em bibliotecas de formação do basidioma para reprodução.

Comparando esses dados com o mostrado nas figuras 16 e 17, os dados obtidos por RNASeq corroboram nossos dados de RT-PCR. Os genes *MpCP4* e *MpCP5* são expressos na interação com a planta e nos esporos, *MpCP2* e *MpCP3* expressos em placa e *MpCP1* é

expresso em basidiomas. Como citado anteriormente, as cópias denominadas MpCP6-12 foram identificadas posteriormente, apenas com as análises dos resultados do experimento de sequenciamento de RNA. Por este motivo não foram feitas análises por Real-time com essas cópias, apenas com as cinco primeiras.

Pode-se observar que a expressão é bem diferente entre as cópias, gerando a hipótese de que cada cópia, ou grupo de cópias semelhantes, possa fazer parte de uma função diferente no fungo durante a doença.

Estes dados novamente sugerem a hipótese de que essa família de genes continua em processos de duplicação no genoma, podendo cada um desses três grupos ter sido originado de uma separação anterior evolutivamente falando e, posteriormente, novas duplicações ocorreram (Garzón-Espinoza et al., 2010).

Um resultado interessante com essa análise é a verificação de que quase todas as cópias identificadas no genoma são expressas pelo fungo (apenas uma não teve sua expressão confirmada *MpCP6*). Este dado reforça a hipótese de que essa família de genes é importante para *M. perniciosa*, pois sofreu inúmeras duplicações em seu genoma, enquanto outros fungos apresentam no máximo duas cópias de CPs (Pazzagli et al., 2009; Yang et al., 2009). Além disso, as cópias são expressas pelo fungo em diferentes momentos, ou seja, estão em processo de evolução e diferenciação inclusive nas regiões promotoras (Nei e Rooney, 2005; Garzón-Ospina et al., 2010).

### **Análises de expressão das CPs em *Moniliophthora roreri***

Os experimentos com material genético de *M. roreri* foram realizados no laboratório SPLC, com frutos infectados coletados no Equador e com o material coletado de frutos infectados em laboratório.

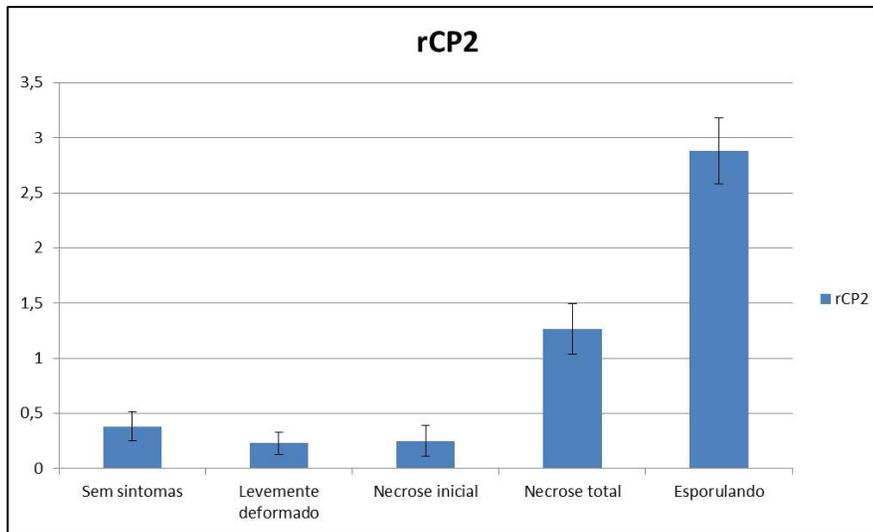


Figura 19 - Estudo de expressão de *MrCP2* em frutos infectados no campo com Monilíase. Os dados estão mostrados com relação à expressão do gene de actina de *M. roseri* nas mesmas situações.

A expressão do gene CP em *M. roseri* parece estar relacionada com a fase dos sintomas da doença, quando o fruto está totalmente necrosado, sendo mais expresso já em fase de esporulação. É difícil fazer uma comparação com a Vassoura-de-Bruxa pelo fato de existirem muitas cópias no genoma de *M. pernicioso* contra apenas uma em *M. roseri*. Por esse motivo escolhemos a cópia de CP que mais se assemelha em padrão de expressão ao observado em *M. roseri* (MpCP2) e fizemos uma análise comparativa de expressão entre esses dois genes com material coletado em laboratório.

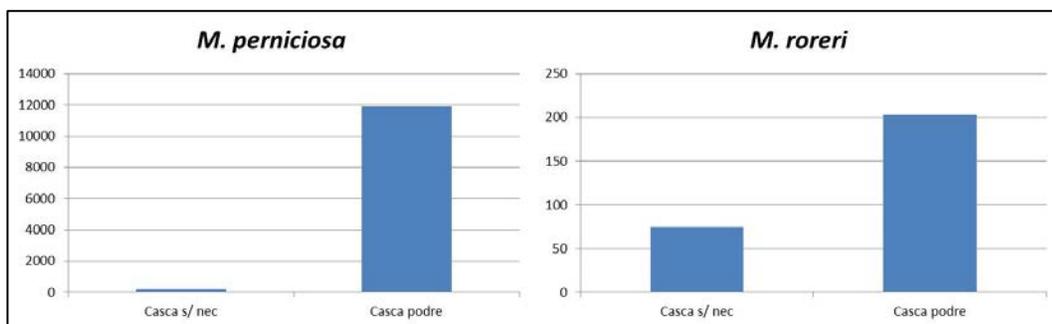


Figura 20 - Análise de expressão dos genes NEP em frutos de cacau infectados com *M. pernicioso* e *M. roseri*. Os dados estão mostrados com relação à expressão do gene de actina de cada fungo respectivamente, avaliados nas situações de cada experimento.

Como podemos observar na figura 20, as duas cópias apresentam um padrão de expressão semelhante, sendo mais expressas quando os sintomas de necrose das doenças já estão mais avançados. Apesar de estarmos comparando dois experimentos diferentes, podemos observar a grande diferença de expressão em relação à actina do fungo. A expressão do gene MpCP2 em casca de frutos podres pelo fungo da Vassoura-de-Bruxa é uma das mais elevadas durante toda a doença.

É interessante observar a detecção de apenas uma cópia de CP em *M. royeri* até o momento, expressa apenas na fase de necrose, enquanto em *M. perniciosa* existam onze cópias expressas pelo fungo, em diferentes fases da doença, inclusive fases assintomáticas. As diferenças observadas entre as doenças – com uma fase de dormência clara em *M. perniciosa* contra uma doença de sintomas mais rápidos de necrose em *M. royeri*, pode indicar uma função inicial das CPs na Vassoura-de-Bruxa que não ocorra na Monilíase.

### **Expressão de genes de defesa em plantas após contato com as CPs**

Uma vez que diversos autores descreveram a capacidade das CPs elicitarem respostas de defesa em plantas, incluindo a ativação da expressão de genes de defesa, surgiu a ideia de realizarmos testes de expressão gênica em planta após terem sido desafiadas com as CPs em estudo. Com esse fim foram realizados dois experimentos diferentes, primeiro com discos de folhas de cacau em contato com as proteínas em solução, e depois testes em cultura de células de tabaco.

### **Células de cacau**

Na tentativa de mimetizar ao máximo o objeto principal de estudo desse trabalho, a interação entre o fungo *M. perniciosa* e o cacau, colocamos as proteínas CPs de *M. perniciosa* em solução em contato com folhas de cacau.

Um conjunto de primers foi escolhido a fim de detectar possíveis alterações nos mecanismos de defesa do cacau, amplamente descritos como expressos em situações de estresse e/ou de indução de defesa em plantas (Bae et al., 2005). Uma vez que esses genes são expressos em situação de estresse, realizamos um experimento inicial apenas com água como controle do estresse gerado pela formação dos discos com as folhas. O resultado, como pode ser visto na figura 21, mostra a expressão de todos os genes analisados com exceção da PR1, causada apenas pelos ferimentos nas folhas. A fim de tentar eliminar esse

efeito indesejado ao nosso experimento, os discos foram deixados em água por 48hs previamente ao desafio com as proteínas.

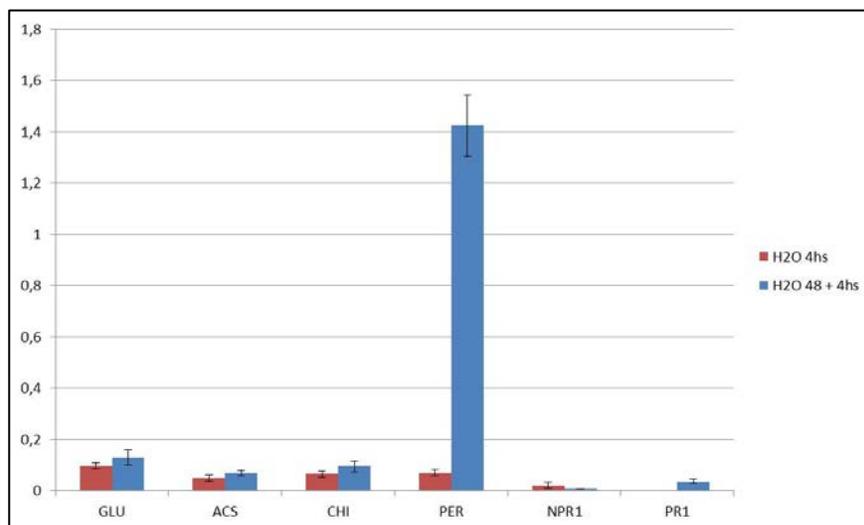


Figura 21 - Análise de expressão dos genes de defesa em disco de folhas de cacau após. Glucanase (GLU), o gene da via do etileno ACS sintase (ACS), Quitinase (CHI), Peroxidase (PER), um fator de transcrição do gene PR1 (NPR1) e PR1 (PR1). Em vermelho os discos de cacau foram tratados com água e seu material genético coletado após 4 horas, enquanto em azul os discos foram cortados, esperou-se 48 horas foram tratados com água e então após 4 horas teve seu material genético coletado. Os dados estão mostrados em relação à expressão do gene da subunidade ribossomal 18S de cacau.

Conforme observado, pouco se alterou na expressão dos genes, com exceção da do gene da Peroxidase que apresentou uma expressão ainda mais elevada e PR1 que com esse tempo a mais apresentou sinal de expressão.

Realizou-se então o experimento com as proteínas considerando então como expressão basal os efeitos observados nos discos com água, utilizando o método “2-(Delta Delta C(T))” (Livak, 2001). Desta forma, o esperado é de que qualquer efeito observado acima da base fosse causado pelo contato com as proteínas, e não pelo modelo do experimento.

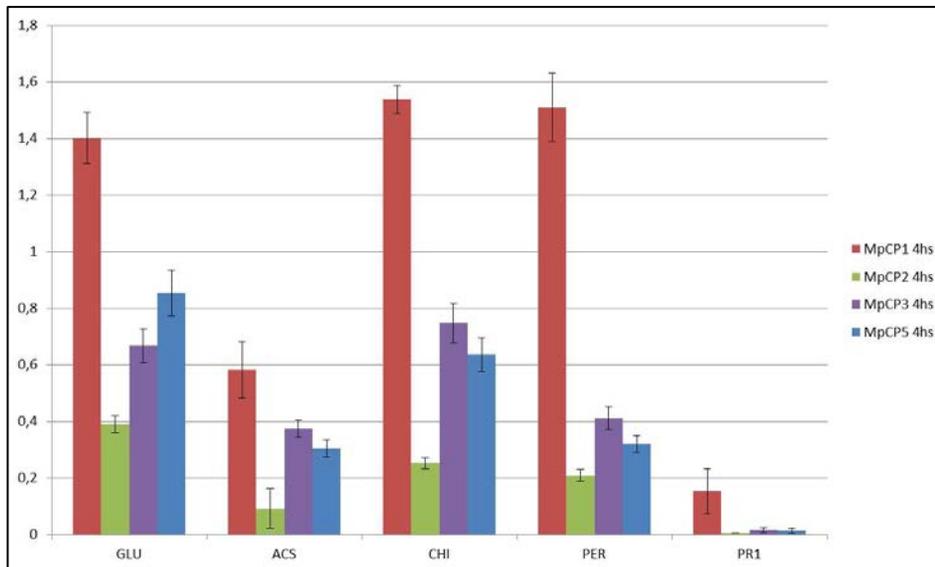


Figura 22 - Análise de expressão dos genes de defesa em folhas de cacau após contato com as proteínas em estudo. Glucanase (GLU), o gene da via do etileno ACS sintase (ACS), Quitinase (CHI), Peroxidase (PER), um fator de transcrição do gene PR1 (NPR1) e PR1 (PR1). Os dados estão mostrados em relação ao experimento controle com discos de cacau tratados com água, padronizados utilizando-se o gene da subunidade ribossomal 18S de cacau para cada situação.

O resultado obtido mostra que, nessas condições de 4 horas após o contato, as proteínas elicitam de maneira diferente a expressão dos genes de defesa, sendo MpCP1 a proteína que gera respostas mais intensas nas folhas de cacau.

Curiosamente, MpCP1 é a única proteína que resulta em respostas mais fortes do que o controle (números no gráfico maiores que 1 considerado o efeito causado pelo controle nesse método de análise). Embora não existam relatos sobre isso na literatura, a primeira hipótese que surgiu ao se analisar estes dados foi a de que as proteínas estariam efetuando uma repressão nos genes de defesa em estudo. Por exemplo, analisando o gene da PR1, todas as proteínas elicitam uma expressão muito mais baixa do que o tratamento com água.

Ao realizamos um teste de expressão ao longo tempo de exposição às proteínas (figura 23), refutamos essa hipótese e nos fez repensar sobre o tempo de experimento utilizado. Podemos observar que a expressão dos genes de defesa é muito rápida utilizando este sistema de inoculação das proteínas, ocorrendo mais intensamente nos primeiros 15 minutos ou 1 hora após o desafio.

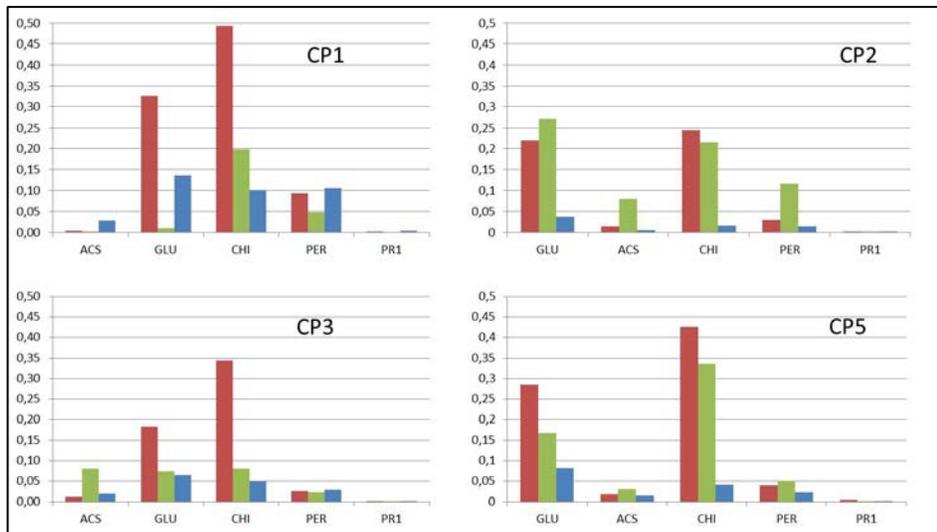


Figura 23 - Análise de expressão dos genes de defesa durante o tempo, em folhas de cacau tratadas com as proteínas MpCP1, MpCP2, MpCP3 e MpCP5. Glucanase (GLU), o gene da via do etileno ACS sintase (ACS), Quitinase (CHI), Peroxidase (PER), um fator de transcrição do gene PR1 (NPR1) e PR1 (PR1). A barra vermelha representa 15 minutos, a verde 1 hora e a azul 4 horas após o tratamento. Os dados estão representados em relação à expressão do gene da subunidade ribossomal 18S do cacau.

Como a expressão durante os primeiros momentos de contato com as proteínas são maiores com todas as proteínas, outra hipótese levantada para a repressão observada na figura 23 é a de que as proteínas induzem a expressão dos genes de defesa logo nos momentos iniciais, fazendo com que o próprio *feedback* das proteínas de defesa gere a inibição dos genes a 4 horas. Necessitaríamos de uma análise mais detalhada com 15 minutos de tratamento para responder a essas questões.

O tempo de 4 horas foi escolhido inicialmente para a realização dos experimentos com base na literatura, sendo que esse tempo é descrito como o tempo mínimo para respostas a CPs (Frías et al., 2005; Yang et al., 2009). Por outro lado, ambos os estudos realizaram análises através de expressão transiente das proteínas em plantas, enquanto nosso estudo resulta de contato direto de uma solução de proteínas com ferimentos das plantas, possivelmente ocasionando o contato com o hospedeiro mais rapidamente.

Uma vez que o intuito do projeto seria a utilização desse material para confecção de uma biblioteca de RNA e analisar o transcriptoma das folhas de cacau após contato com cada uma das proteínas, tivemos que alterar o modelo de estudo. A quantidade de RNA obtida com esse método dos discos apresentou-se muito baixa para análise por RNASeq. Além disso, o fato de o próprio método utilizado interferir nos resultados gerariam ruídos

muito elevados de expressão gênica, ou mesmo poderiam mascarar algum resultado importante, no momento de análise desses transcriptomas. Por esses motivos, passamos a utilizar células em cultura.

### **Células de tabaco**

Inicialmente tentamos a manutenção de células de cacau em cultura para a realização do experimento, com a finalidade de utilizar o hospedeiro natural do fungo. Porém, não foi possível a manutenção das células em nosso laboratório com a qualidade desejada para um experimento padronizado de desafio das células em cultura com as proteínas. As células apresentaram crescimento irregular e formação de agrupamentos, o que poderia dificultar o contato com as proteínas. Além disso, ainda não tínhamos um protocolo de extração de RNA para as células de cacau otimizado.

Optamos então por utilizar células de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. BY2 – *Bright Yellow 2*) em cultura, linhagem modelo e já amplamente descrita na literatura, inclusive com proteoma e transcriptomas descritos relacionado a células em cultura (Nagata et al., 1992; *BY-2 data homepage*).

As análises mostraram pouca alteração nas expressões, analisadas por Real-Time PCR utilizando-se como gene controle a actina e células tratadas apenas com tampão como experimento controle. A expressão de genes relacionados a estresse em células de controle do experimento sem tratamento manteve-se a mesma que a observada nos tratamentos, como o ocorrido com os discos de cacau.

Maiores análises devem ser realizadas nesse sentido, principalmente com relação aos controles experimentais escolhidos, para podermos confirmar alguma das hipóteses aqui mencionadas com relação à expressão de genes de defesa nas plantas após contato com as CPs de *M. perniciosa*. A perspectiva com relação a esse estudo é a de utilizar um modelo melhor padronizado ou, como já citado, ampliar o experimento com discos de folhas de cacau utilizando folhas tratadas apenas com tampão padronizando os experimentos.

### **Análises estruturais das MpCPs**

Os resultados de estrutura e de outros tipos de análises físicas foram obtidos em parceria com o LNBio, sob supervisão da Pesquisadora Dra. Sandra Dias e com o auxílio

da aluna de pós-doutorado Dra. Juliana Oliveira e do aluno de mestrado Mario Ramos de Oliveira Barsottini.

Com o alto grau de pureza das proteínas, no estado monodisperso em que se encontram após o método de expressão e purificação B (confirmados por análises de Espalhamento de Luz Dinâmico – DLS), foi possível realizar tentativas de obtenção de cristais difratáveis.

As proteínas foram submetidas a ensaios de cristalização empregando-se kits comerciais e o robô Honey-bee (Genomic Solutions). Obtiveram-se então cristais das proteínas MpCP1, MpCP2, MpCP3 (mostrados na figura 24) e posteriormente de MpCP5. Os cristais obtidos foram então coletados em condições criogênicas nas linhas de luz MX1 e MX2 do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (CNPEM).

Os modelos finais obtidos serão depositados no banco de dados PDB ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) e utilizados para posteriores estudos associados ao projeto. A tabela contendo os dados coletados para MpCP1, MpCP2 e MpCP3 está disposta a seguir (Tabela 2). Os modelos obtidos das estruturas tridimensionais das proteínas estão apresentados em forma de fitas na figura 25.

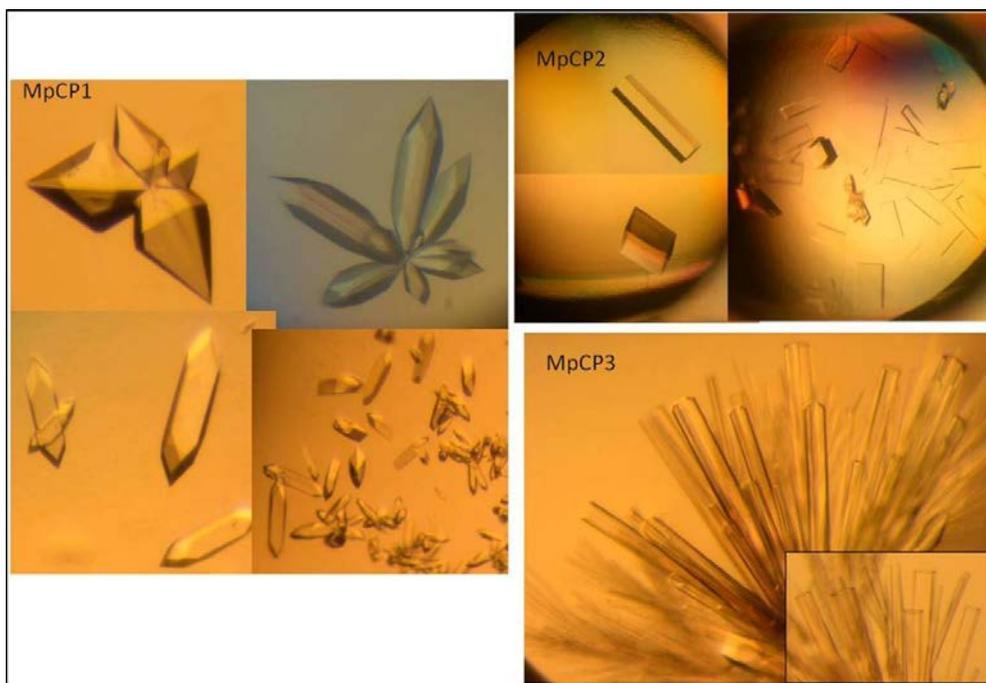


Figura 24 - Fotos tiradas dos cristais obtidos com as proteínas MpCP1, MpCP2 e MpCP3 nas linhas de luz MX1 e MX2 do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (CNPEM).

**Tabela 2- Parâmetros e estatísticas dos dados coletados dos cristais das proteínas**

	MpCP1	MpCP2	MpCP3
Space group	P4 <sub>2</sub> ,2	P12 <sub>1</sub> ,1	P3 <sub>2</sub> ,1
Cell dimensions (Å) and angles (°)	a = b = 45.3, c = 105.5	a = 29.5, b = 86.0, c = 43.6, $\beta$ = 100.	a = b = 48.3, c = 93.9
Resolution (Å)	14.61-1.34 (1.41-1.34)	14.62-1.34 (1.41-1.34)	14.11-1.63 (1.72-1.63)
Unique reflections	25598 (3654)	43181 (5984)	16287 (2314)
Redundancy	39.3 (36.9)*	8.3 (8.2)	13.2 (13.2)
R <sub>symm</sub> (%)	8.5 (51.8)	6.5 (27.0)	5.4 (59.0)
Completeness (%)	99.8 (100)*	92.4 (87.7)	99.2 (98.4)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	42.1 (11.7)	22.2 (8.9)	25.5 (4.3)
Beamline	W01B-MX2	W01B-MX2	D03B-MX1
Structure solution method	Sulfur - SAD	MR	MR
Monomers/AU	1	2	1
Solvent content (%)	37.25	40.98	51.43
No. sites found (expected)	8 (7)	-	-
Mean map CC (%)	76.6	-	-
Refinement statistics and model quality			
Rfactor/Rfree (%)	18.29 / 22.08	17.32 / 20.50	23.77 / 26.77
No. of non-H atoms	1122	2220	992
No. of residues	123	124	121
No. of waters molecules	164	463	160
Average B-factor/r.m.s.d. (Å)			
main chain (residues)	11.56 / 0.86	10.95 / 0.84	20.76 / 0.99
side chain (residues)	14.93 / 2.17	12.71 / 1.65	22.56 / 1.96
solvent (molecules)	26.94	24.60	31.01
R.m.s.d. from standard geometries			
bond length (Å)	0.025	0.024	0.023
bond angles (Å)	2.257	1.698	2.230
Ramachandran plot			
Most favoured region (%)	95.73	96.64	94.12
Additional allowed region (%)	3.42	2.52	4.20
Generously allowed (%)	0.85	0.84	1.68
* Friedel pairs treated separately			

A estrutura das MpCPs resolvidas podem ser observadas e analisadas nas figuras 25 e 26. A estrutura identificada mostra um domínio bem formado, composto por seis fitas do tipo “ $\beta$ -barrel” flanqueadas por pequenos loops e  $\alpha$ -hélices. As seis fitas dispostas dessa maneira originam dois falsos eixos, formando duas estruturas Psi, conhecida como “*double-psi beta barrel*”. Os dois monômeros identificados no cristal da MpCP2 não condizem com os dados de DLS analisados, sendo portanto um artefato da cristalização.

Estruturas do tipo “barril beta” são formadas por folhas-beta torcidas, formando uma estrutura tridimensional fechada, na qual a primeira fita está ligada à última através de ligações de hidrogênio. São estruturas normalmente encontradas em proteínas que atravessam a membrana celular e/ou se ligam a resíduos hidrofóbicos (Wimley et al., 2003). Além disso, esse domínio é característico de expansinas, endoglucanases (Castillo et al., 1999) e das proteínas de defesa do tipo *barwin* (Ludvigsen e Poulsen, 1992).

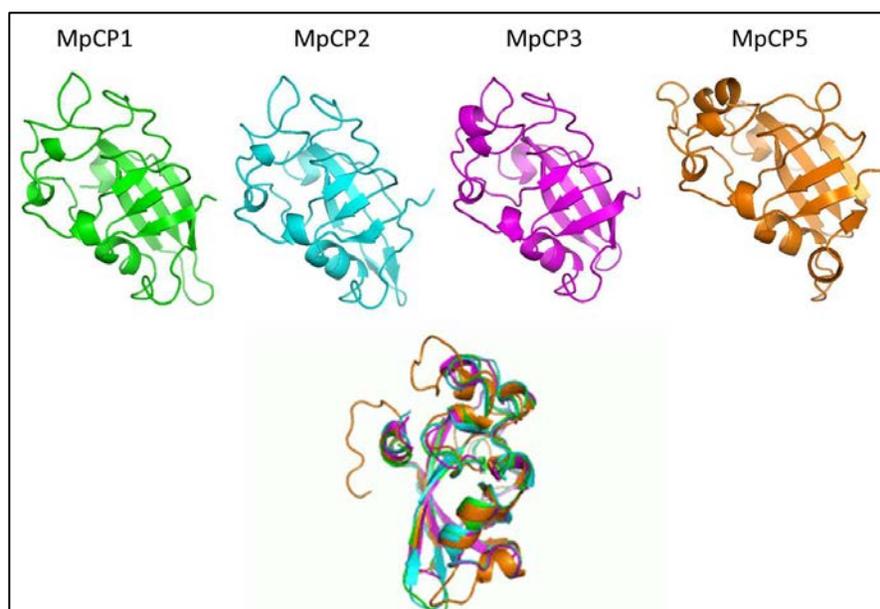


Figura 25 - Modelo em fitas da estrutura tridimensional das MpCPs. Abaixo se encontra uma sobreposição do modelo das quatro proteínas mostradas. Estruturas em forma de seta representam folhas beta, hélices representam alfa-hélices e os fios representam *loops* e outras regiões sem conformação estrutural secundária.

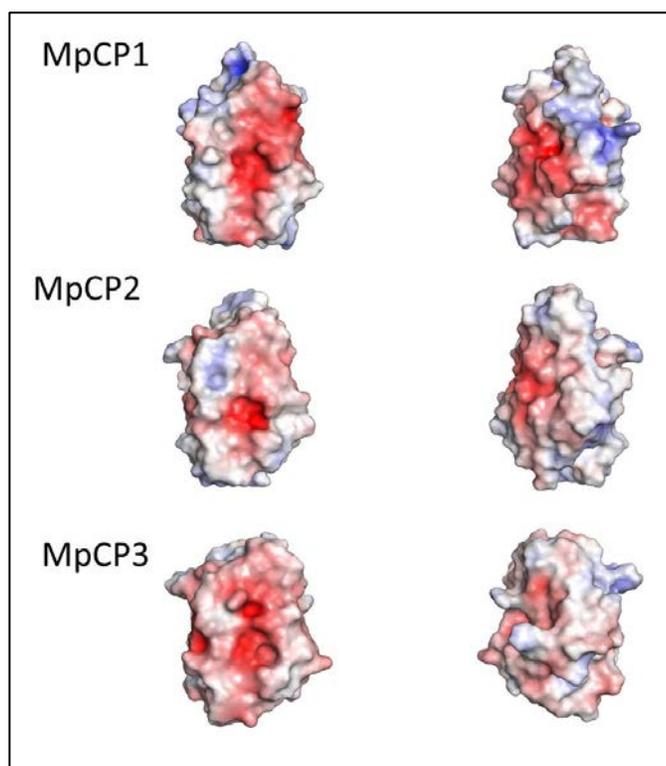


Figura 26 – Superfície eletrostática das proteínas MpCP1, MpCP2 e MpCP3, calculada com o auxílio do programa Pymol. Em vermelho estão representadas regiões negativas e em azul positivas.

A superfície eletrostática do modelo da proteína MpCP1 (Figura 26) mostra um grande região de resíduos carregados negativamente em um dos lados da molécula, formando um *pocket* negativo para possíveis ligantes nessa região. A mesma região é encontrada nas moléculas de MpCP2 e MpCP3, mas em área menor. A estrutura é muito semelhante à identificada em *C. platani* pelo método de RMN (de Oliveira et al., 2011).

São proteínas com enovelamento semelhantes à expansinas, que são pequenas proteínas secretadas de plantas, que promovem a extensão da parede celular das células através de modificações no turgor celular. As proteínas ligam-se aos açúcares encontrados na parede, e induzem extensão e relaxamento das paredes celulares, auxiliando no crescimento da planta (Yennawar et al., 2006). A função de relaxamento das paredes celulares causada pelas expansinas é descrita como auxiliar em processos como abscisão de órgãos e frutos, germinação de sementes, amolecimento da poupa de frutos e invasão do tubo polínico no estigma (Rose et al., 1997, Chen et al., 2001, Belfield et al., 2005).

As estruturas são muito semelhantes entre si, com algumas diferenças significativas em seus loops, principalmente nas superfícies das moléculas e na região carregada negativamente da superfície (sobreposição da figura 25 e figura 26). Estas superfícies podem permitir interação com diferentes ligantes, provavelmente açúcares de parede de fungos, de acordo com algumas análises preliminares. A estrutura da MpCP5 foi identificada como sendo a mais diferente das outras três resolvidas.

Estas diferenças podem estar relacionadas com diferentes funções durante a doença, lembrando que o gene referente à MpCP1 é expresso apenas em basidiomas, enquanto MpCP2 e MpCP3 durante estágios da doença com muito nutriente disponível, e MpCP5 o único expresso durante a interação com o a árvore do cacau na Vassoura-de-Bruxa.

Além disso, a presença de proteínas que facilitem o afrouxamento da parede celular da planta (semelhança com expansinas) para a penetração do fungo durante a doença seria de grande valor adaptativo ao fungo, principalmente na fase inicial da doença. A semelhança com endoglucanases detectada através da estrutura é interessante, uma vez que essas proteínas se ligam a oligossacarídeos. de Oliveira e colaboradores detectaram uma ligação fraca com oligo-N-acetilglucosamina, um dos principais componentes da parede de fungos (2011). Este fato pode estar relacionado à proteção estrutural contra agentes

externos, como as proteínas relacionadas à patogenicidade (PRs), que possuem genes expressos pela planta no momento da infecção.

Recentemente foi descrito na literatura que o fungo *Ceratocystis platani* expressa o gene referente à proteína Ceratoplatanina acompanhando o crescimento do fungo, ou seja, em condições favoráveis em que o fungo cresce, está expressando o gene *CP*, em condições desfavoráveis quando o crescimento está retardado não há expressão (Bacelli et al., 2012).

Os dados auxiliam a hipótese de que os membros dessa família possam ter um papel estrutural durante o crescimento, apesar de estudos da deleção desses genes mostrarem que o crescimento ou morfologia das hifas não são afetados (Djonovic et al., 2007; Yang et al., 2009). Da mesma maneira, o fungo pode estar produzindo as CPs como proteção da sua parede, o que corrobora os dados de expressão paralela ao crescimento das hifas.

Como já citado previamente no texto, o que podemos concluir referente às CPs em *M. perniciosa* é que possuem alguma função importante ao fungo durante a doença. Este fato é corroborado pela ampla quantidade de genes quando comparamos com outros fungos, além do fato de quase todos serem expressos por *M. perniciosa*. A expressão de cada cópia ocorre de maneira diferenciada, evidenciando a possibilidade de diferentes funções por cada uma delas ou mesmo por cada grupo com padrões semelhantes de expressão, como podemos observar na figura 18.

Apesar de o experimento de expressão dos genes de defesa em cacau e tabaco não ter tido os resultados esperados em termos do controle experimental, podemos observar que cada uma das cópias de CPs testadas elicitam também de forma diferente os genes PRs da planta (figuras 21 a 22). Novamente, estes resultados referem-se a diferentes modos de ação por parte das proteínas, ou mesmo a diferente presença de padrões na superfície de suas moléculas que são reconhecidos de forma diferente pelos mecanismos de defesa da planta, agindo como MAMPs, mas de forma diferenciada.

Esta hipótese é corroborada com a verificação das estruturas tridimensionais das proteínas e o fato de que as superfícies das moléculas apresentam diferenças significativas, podendo estar relacionadas com a identificação por parte das defesas da planta (figura 26).

Os dados de estrutura nos levam à perspectiva de identificar possíveis ligantes a essa família de proteínas, relacionados com açúcares da parede celular do próprio fungo ou mesmo da planta.

## **CAPÍTULO III – Discussão final referente ao modelo proposto para a atuação das proteínas NLPs e CPs durante a doença Vassoura-de-Bruxa**

Comparando os efeitos aqui discutidos e de literatura, podem-se observar grandes diferenças entre as proteínas da família das NLPs e das Ceratoplataninas. Enquanto as NLPs agem como uma toxina causando morte celular e necrose restrita ao local inoculado, as CPs funcionam como elicitores e são reconhecidas como MAMPs pelos mecanismos de defesa das plantas, resultando em alguns casos em morte celular programada e necrose espalhada ao redor da inoculação.

Quando inoculadas em conjunto, MpCP1 e MpNEP2 apresentaram sintomas de necrose mais intensos na folha de cacau (Zaparoli 2007), sugerindo que a destruição causada pela MpNEP2 possa ser tão intensa que impede a movimentação de moléculas pelo sistema de vasos da folha, impedindo assim a disseminação da resposta de defesa à MpCP1. Bloqueios do sistema de transporte da planta inviabilizariam a realocação de nutrientes por parte dos ramos infectados, mantendo assim a região onde o fungo se encontra com fartura de nutrientes.

### **Modelo de atuação**

Após invadir o meristema das árvores de cacau o fungo *M. pernicioso* encontra um ambiente hostil formado pelas defesas da planta, com geração de ROS, NO, expressão de proteínas PRs e outras proteínas de defesa. Esse é um momento crucial para o sucesso da doença e, por isso, a guerra entre moléculas da planta e do fungo é intensa. De alguma maneira o fungo consegue permanecer entre as células da planta após germinar, mesmo que em crescimento retardado, sem ser detectado.

*M. pernicioso* produz um arsenal próprio de moléculas evasivas e de defesa, únicos até então na literatura, como por exemplo, a presença de uma oxidase alternativa em sua mitocôndria que se liga em situação de estresse, mantendo o fungo em baixo crescimento mesmo na presença de moléculas tóxicas que bloqueia a cadeia respiratória de fungos, como NO (Tomazella et al., 2012). Além disso, foi descoberto que *M. pernicioso* produz

proteínas da família das PR1, provavelmente utilizadas de forma a confundir os mecanismos de defesa do cacaueteiro (Teixeira et al., 2012).

Durante este momento inicial, desde a germinação dos esporos até a transição dos sintomas da doença, *M. perniciosa* expressa os genes referentes às proteínas MpCP4, MpCP5, MpCP11 e MpCP12. Com a possível função de proteger a parede do próprio fungo ligando-se a oligossacarídeos da parede, *M. perniciosa* estaria mais protegido das agressões sofridas pelas enzimas da planta.

Quando o ambiente no interior da planta torna-se muito hostil para as hifas do fungo, por falta de nutrientes disponíveis (Joan Barau, artigo em preparação), ocorre então a expressão de um conjunto de genes ligados a mudança de fase. Esse fato aparentemente ocorre individualmente em cada hifa e em um processo semelhante ao *corum sensing* de bactérias, as hifas ao redor percebem as mudanças e também sofrem dicarionização, mudando de fase.

Dentro desse conjunto de genes ativados pela falta de nutrientes está o gene da proteína MpNEP2. Como pudemos observar, *MpNEP2* é expresso acompanhando os sintomas de necrose da doença, com seu maior pico momentos antes da mudança para vassoura-seca (Zaparoli et al., 2011). *MpNEP2* é um dos genes expressos em resposta à falta de nutrientes (Joan Barau, artigo em preparação).

Uma vez secretada dentro da planta e em contato com as células ao redor, a MpNEP2 provoca ruptura da membrana celular e conseqüente extravasamento de seu conteúdo interno, provocando uma reação em cadeia que culmina com a total destruição das células ao redor da hifa, liberando mais espaço para o fungo crescer. Durante a fase necrotrófica, *M. perniciosa* possui hifas de crescimento acelerado e, portanto, esses espaços liberados seriam essenciais para a colonização do ramo todo, secretando mais MpNEP2 em diferentes locais e culminando com a necrose do ramo infectado e os sintomas característicos observado nas vassouras-secas.

Neste momento inicia-se a expressão de MpCP3, com possível função estrutural e de auxílio no crescimento acelerado das hifas de *M. perniciosa*. Da mesma forma em frutos infectados, nesse momento ocorre a expressão principalmente de MpCP2, juntamente com MpCP3. A provável função de auxílio no crescimento acelerado das hifas continua fazendo sentido, uma vez que quando os frutos apodrecem, o fungo deve crescer e obter os

nutrientes da maneira mais rápida possível, pois outros fungos e até mesmo insetos ou animais são atraídos ao local rapidamente.

Da mesma forma pode-se levar essa hipótese à Monilíase, com a expressão da MrCP2 crescendo com o surgimento dos sintomas de necrose no fruto.

Durante a formação dos basidiomas de *M. perniciosa* nos ramos necrosados da vassoura-seca, o fungo produz MpCP1, que pode estar realizando novamente uma função estrutural auxiliando na formação e crescimento dos cogumelos, como descrito para as hidrofobinas. E dessa forma o ciclo da doença se reinicia.

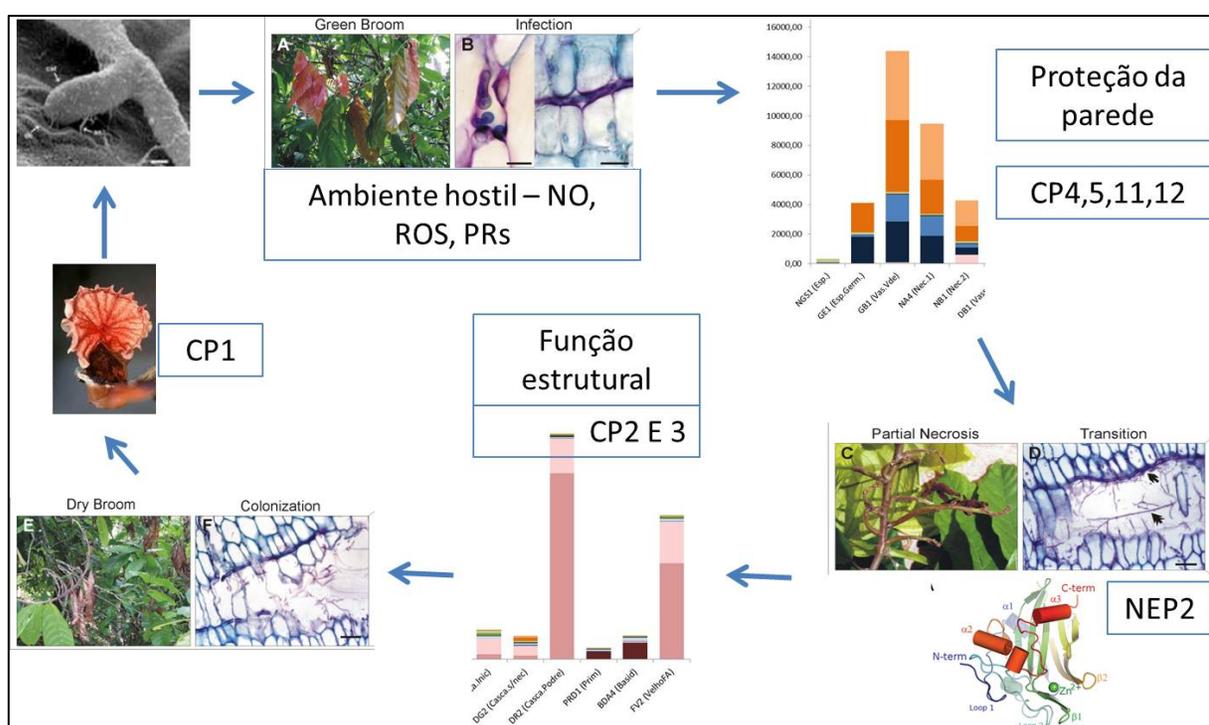


Figura 27 - Modelo esquematizado da ação das proteínas durante a Vassoura-de-Bruca. Da esquerda superior em sentido horário, o ciclo inicia-se com a germinação dos esporos de *M. perniciosa* e penetração das hifas monocarióticas na planta de cacau. O fungo encontra então um ambiente hostil e permanece como um parasita, iniciando os sintomas da Vassoura-Verde. Nessa fase o fungo secreta CPs com função de proteção da sua parede contra ataques da planta. A falta de nutrientes é um sinal para mudança de fase e o fungo torna-se dicariótico, momento em que secreta NEP2 e destrói as células ao redor, gerando mais espaço para o crescimento acelerado dessa fase. Nesse momento o fungo secreta outras cópias de CPs com função estrutural. Neste momento os sintomas já são de vassoura-seca com necrose total dos ramos infectados e o fungo então produz o basidiocarpo com auxílio da CP1 e reinicia o ciclo produzindo novos esporos.

## Indução de respostas de defesa

O fato de as CPs induzirem resposta de defesa em plantas agindo como MAMPs é um consenso na literatura, mas o que isso representa aos patógenos ou mesmo se esse

sistema é usado em seu benefício durante as doenças, continua sem resposta. Estamos propondo aqui a hipótese de que *M. pernicioso* possa atrapalhar os mecanismos de defesa da planta com diferentes moléculas reconhecidas como MAMPs ao mesmo tempo, enquanto defende-se de outras maneiras das respostas geradas pela planta e permanece vivo gerando novos MAMPs.

Este sobrecarregamento do sistema de defesa pode gerar um desbalanço hormonal que acarrete nos sintomas de vassoura-verde. Conforme mencionado, caso a planta esteja ganhando a batalha de defesa ou os nutrientes estejam muito baixo, o fungo muda de fase e mata a planta, evitando assim o sucesso dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

## Referências

**Aime**, M. C. e **Phillips-Mora**, W. (2005). "The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae." *Mycologia* 97(5): 1012-22.

A História do Cacau e Chocolate **ABICAB** - Associação Brasileira da Indústria de Chocolate, Cacau, Balas e Derivados – [www.abicab.org.br](http://www.abicab.org.br)

**Alger**, K. e **Caldas**, M. (1996). Cacau na Bahia – decadência e ameaça à Mata Atlântica. *Ciência Hoje* 177:28-35.

**Alabouvette**, C., Olivain, C., Migheli, Q., Steinber, C. (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist* 184: 529–544

**Alvim**, F.C., Mattos, E.M., Pirovani, C.P., Gramacho, K., Pungartnik, C., Brendell, M., Cascardo, J.C.M., Vincentz, M. (2009). Carbon source-induced changes in the physiology of the cacao pathogen *Moniliophthora pernicioso* (Basidiomycetes) affect mycelial morphology and secretion of necrosis-inducing proteins. *Genet. Mol. Res.* 8(3):1035-1050.

**Allen**, R.L., Bittner-Eddy, P.D., Grenville-Briggs, L.J., Meitz, J.C., Rehmany, A.P., Rose, L.E. and Beynon, J.L. (2004) Host–parasite coevolutionary conflict between *Arabidopsis* and downy mildew. *Science*, 306, 1957–1960.

**Andebrhan**, T. (1987). "Rain-water as a factor in the dissemination of basidiospores of *Crinipellis pernicioso* on cocoa seedlings." In: *Disease Management in Cocoa. Comparative*

epidemiology of witches' broom. Eds. S. A. Rudgard, A. C. Maddison and T. Anderbrhan, Chapman & Hall, London.: 157-164.

**Apel, K. e Hirt, H.** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399.

**Bacelli, I., Comparini, C., Bettini, P.P., Martellini, F., Ruocco, M., Pazzagli, L., Bernardi, R., Scala, A.** (2012). The expression of the cerato-platanin gene is related to hyphal growth and chlamydospores formation in *Ceratocystis platani*. *FEMS Microbiol Lett* 327: 155-163.

**Bae H, Bowers JH, Tooley PW, Bailey BA** (2005). NEP1 orthologs encoding necrosis and ethylene inducing proteins exist as a multigene family in *Phytophthora megakarya*, causal agent of black pod disease on cacao. *Mycol Res* 109: 1373–1385.

**Bae, H., Kim, M.S., Sicher, R.C., Bae, H.J. and Bailey, B.A.** (2006) Necrosis- and ethylene-inducing peptide from *Fusarium oxysporum* induces a complex cascade of transcripts associated with signal transduction and cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 141, 1056–1067.

**Bailey, B. A.** (1995). "Purification of a Protein from Culture Filtrates of *Fusarium oxysporum* That Induces Ethylene and Necrosis in Leaves of *Erythroxylum coca*." *Phytopathology* 85(10): 1250-1255.

**Bailey, B. A., P. C. Apel-Birkhold, O. O. Akingbe, J. L. Ryan, N. R. O'Neill, and J. D. Anderson.** 2000a. Nep1 protein from *Fusarium oxysporum* enhances biological control of opium poppy by *Pleospora papaveracea*. *Phytopathology* 90:812–818.

**Bailey, B. A., R. Collins, and J. D. Anderson.** 2000b. Factors influencing the herbicidal activity of Nep1, a fungal protein that induces the hypersensitive response in *Centaurea maculosa*. *Weed Sci.* 48:776–785.

**Bailey, B.A.; Strem, M.D.; Bae, H.; de Mayolo, G.A.; Gultinan, M.J.** (2005). Gene expression in leaves of *Theobroma cacao* in response to mechanical wounding, ethylene, and/or methyl jasmonate. *Plant Science* 168:1247-1258.

**Bashi, Z.D., Hegedus, D.D., Buchwaldt, L., Rimmer, S.R., Borhan, M.** (2010). Expression and regulation of *Sclerotinia sclerotiorum* necrosis and ethylene-inducing peptides (NEPs). *Molecular Plant Pathology* 11(1): 43-53.

- Belfield** EJ, Ruperti B, Roberts JA, McQueen-Mason SJ (2005). Changes in expansin activity and gene expression during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra* *J Exp Bot* 56:817–823.
- Bell**, K. S., Sebaihia, M., Pritchard, L., Holden, M. T., Hyman, L. J., Holeva, M. C., Thomson, N. R., Bentley, S. D., Churcher, L. J., Mungall, K., Atkin, R., Bason, N., Brooks, K., Chillingworth, T., Clark, K., Doggett, J., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Norbertczak, H., Ormond, D., Price, C., Quail, M. A., Sanders, M., Walker, D., Whitehead, S., Salmond, G. P., Birch, P. R., Parkhill, J. and Toth, I. K. (2004). "Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(30): 11105-10.
- Bent**, A.F. e **Mackey**, D. (2007). Elicitors, Effectors, and *R* Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annu Rev Phytopathol.* 45:399-436.
- Bernardi**, R. (2008). Cerato-platanin pre-treated plane leaves restrict *Ceratocystis platani* growth and overexpress defense-related genes, *J. Plant Pathol.* 90: 295–306.
- Boller**, T. e **He**, S.Y. (2009). Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens. *Science* 324
- Boller** T e **Felix** G (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60: 379–406
- Boddi**, S., Comparini, C., Calamassi, R., Pazzagli, L., Cappugi, G. and Scala, A. (2004). Cerato-platanin protein is located in the cell walls of ascospores, conidia and hyphae of *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *FEMS Microbiol Lett* 233(2): 341-6.
- Bowers**, J. H., Bailey, B. A., Hebbar, P. K., Sanogo, S., Lumsden, R. D. 2001. The impact of plant diseases on world chocolate production. *Plant Health Progress* – [www.apsnet.org/online/feature/cacao](http://www.apsnet.org/online/feature/cacao)
- Burdrige**, E., Diamond, M., Dix, P., McCabe, P. (2006). "Use of cell morphology to evaluate the effect of a peroxidase gene on cell death induction thresholds in tobacco." *Plant Science* 172: 853-860.
- BY-2 data homepage**. <http://www.pdata.ua.ac.be/BY2>
- Castillo**, R. M., Mizuguchi, K., Dhanaraj, V., Albert, A., Blundell, T. L., and Murzin, A. G. (1999) *Structure* 7, 227–236

**Carresi L**, Pantera B, Zoppi C, Cappugi G, Oliveira AL, Pertinhez TA, Spisni A, Scala A, Pazzagli L, 2006. Ceratoplatanin, a phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata*: expression in *Pichia pastoris*, purification and characterization. *Protein Expression and Purification* 49: 159–167.

**Ceita GO**, Macêdo JNA, Santos TB, Alemanno L, Gesteira AS, Micheli F, Mariano AC, Gramacho KP, Silva DC, Meinhardt LW, Mazzafera P, Pereira GAG, Cascardo JM (2007). Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Sci* 173(2):106-117.

**CEPLAC** – Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - <http://www.ceplac.gov.br>

**Chen F**, Dahal P, Bradford KJ (2001) Two tomato expansin genes show divergent expression and localization in embryos during seed development and germination *Plant Physiol* 127:928–936.

**Chisholm**, S. T., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz, B. J. (2006). "Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response." *Cell* 124(4): 803-14.

**Coady**, C. A História do chocolate, In: O Guia do chocolate, ed. Livros e Livros, 1998, pp.7-15.

**Collaborative Computational Project**, Number 4 (1994) The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallogr. D*50, 760–763.

**Dand,R.** (1999). The International Cocoa Trade. Cambridge, Woodhead Publishing, Limited, p.44.

**Dangl JL e Jones JD** (2001) Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411: 826–833.

**de Jonge**, R., van Esse, H. P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M. H., and Thomma, B. P. (2010) *Science* 329, 953–955.

**de Oliveira AL**, Gallo M, Pazzagli L, Benedetti CE, Cappugi G, Scala A, Pantera B, Spisni A, Pertinhez TA, Cicero, D.O. (2011). The structure of the elicitor Cerato-platanin (CP), the first member of the CP fungal protein family, reveals a double-wb-barrel fold and carbohydrate binding. *J Biol Chem* 286: 17560–17568.

- do Rio** MCS, Oliveira BV, Thomazella DP, Fracassi da Silva JA, Pereira GAG (2008). Production of calcium oxalate crystals by the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the Witches' Broom Disease of cacao. *Curr Microbiol* 56(4):363-370.
- dos Santos**, A.C.C., Sena, J.A.L., Santos, S.C., Dias, C.V., Pirovani, C.P., Pungartnik, C., Valle, R.R., Cascardo, J.C.M., Vincentz, M. (2009). dsRNA-induced gene silencing in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao. *Fungal Genetics and Biology* 46(11):825-836.
- Dean** RA, Talbot NJ, Ebbole DJ, Farman ML, Mitchell TK, Orbach MJ, Thon M, Kulkarni R, Xu JR, Pan H, Read ND, Lee YH, Carbone I, Brown D, Oh YY, Donofrio N, Jeong JS, Soanes DM, Djonovic S, Kolomiets E, Rehmeyer C, Li W, Harding M, Kim S, Lebrun MH, Bohnert H, Coughlan S, Butler J, Calvo S, Ma LJ, Nicol R, Purcell S, Nusbaum C, Galagan JE, Birren BW (2005). The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434(7036):980-986.
- Delgado**, J. C. e **Cook**, A. A. (1976). "Nuclear Condition of Basidia, Basidiospores, and Mycelium of *Marasmius pernicius*." *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 54(1-2): 66-72.
- Djonovic** S, Pozo MJ, Dangott LJ, Howell CR & Kenerley CM (2006) Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 838–853.
- Djonovic** S, Vargas WA, Kolomiets MV, Horndeski M, Wiest A & Kenerley CM (2007) A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiol* 145: 875–889.
- Durrant**, W.E. e **Dong**, X. (2004) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 185–209.
- Engelbrecht** CJB e **Harrington** TC, 2005. Intersterility, morphology, and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao, and sycamore. *Mycologia* 97, 57–69.
- Emsley**, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D* 66, 486–501. (28) Read, R. J., and Schierbeek, A. J. (1988) *J. Appl. Crystallogr.* 21, 490–495.
- Entwistle** P F (1972) *Pests of Cocoa*. Longman tropical Science Series, London. 779

- Erwin**, D.C. e **Ribeiro**, O.K. (1996). *Phytophthora Diseases World-wide*. St. Paul: APS Press.
- Evans**, H. C. B. (1979). "Uma reavaliação do ciclo de vida da vassoura de bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacau." *Fitopatologia Brasileira* 4: 104.
- Evans**, P. R. (2005) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D*62, 72–82.
- Felix**, G., **Duran**, J.D., **Volko**, S., **Boller**, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18(3):265-76.
- Fellbrich**, G., **Romanski**, A., **Varet**, A., **Blume**, B., **Brunner**, F., **Engelhardt**, S., **Felix**, G., **Kemmerling**, B., **Krzyszowska**, M. and **Nürnberg**, T. (2002). "NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*." *Plant J* 32(3): 375-90.
- Feng**, B.Z., **Li**, P.Q., **Fu**, L., **Sun**, B.B., **Zhang**, X.G. (2011). Identification of 18 genes encoding necrosis-inducing proteins from the plant pathogen *Phytophthora capsici* (Pythiaceae: Oomycetes). *Genetics Mol Res.* 10(2):910-922.
- Flor**, H.H. (1955). "Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications".*Phytopathology* 45: 680–685.
- Flor**, H. H. (1971). "Current status of the gene-for-gene concept." *Annu Rev Phytopathol* 9: 275-296.
- Fontana**, A., **Santini**, M., **Salvini**, L., **Pazzagli**, G., **Cappugi**, A., **Scala**, M., **Durante**, R., **Bernardi** (2008). Cerato-Platanin treated plane leaves restrict *Ceratocystis platani* growth and overexpress defense-related genes. *J.Plant Path.* 90(2):439-443.
- Formighieri** EF, **Tiburcio** RA, **Armas** ED, **Medrano** FJ, **Shimo** H, **Carels** N, **Góes-Neto** A, **Cotomacci** C, **Carazzolle** MF, **Sardinha-Pinto** N, **Rincones** J, **Digiampietri** L, **Carraro** DM, **Azeredo-Espin** AM, **Reis** SF, **Deckmann** AC, **Gramacho** K, **Gonçalves** MS, **Moura Neto** JP, **Barbosa** LV, **Meinhardt** LW, **Cascardo** JCM, **Pereira** GAG (2008). The mitochondrial genome of the phytopathogenic basidiomycete *Moniliophthora pernicioso* is 109 kb in size and contains a stable integrated plasmid. *Mycol Res* 112:1136-1152.
- Frías**, M., **González**, C., **Brito**, N. (2011). BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytologist*.
- Galagan** JE, **Calvo** SE, **Cuomo** C, **Ma** LJ, et al. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438: 1105-1115.

- Garcia-Brugger**, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., Pugin, A. (2006). "Early signaling events induced by elicitors of plant defenses." *Mol Plant Microbe Interact* 19(7): 711-24.
- Garcia**, O., Macedo, J. A., Tiburcio, R., Zapparoli, G., Rincones, J., Bittencourt, L. M., Ceita, G. O., Micheli, F., Gesteira, A., Mariano, A. C., Schiavinato, M. A., Medrano, F. J., Meinhardt, L. W., Pereira, G. A. and Cascardo, J. C. (2007). "Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*." *Mycol Res* 111(4): 443-55.
- Garzón-Ospina** D, Cadavid LF and Patarroyo MA (2010). Differential expansion of the merozoite surface protein (msp)-7 gene family in *Plasmodium* species under a birth-and-death model of evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.* 55: 399-408.
- Gesteira** AS, Micheli F, Carels N, Da Silva AC, Gramacho KP, Schuster I, Macedo JN, Pereira GA, Cascardo JC (2007). Comparative Analysis of Expressed Genes from Cacao Meristems Infected by *Moniliophthora perniciosa*. *Ann Bot (Lond)* 100(1):129-140.
- Ghanta** S, Bathacharyya, T., Chattopadhyay S (2011). Glutathione as a signalling molecule-another challenge to *pathogens*. *Plant Signal Behav.* 6(4): 604-609.
- Gijzen**, M. e **Nürnbergger**, T. (2006) Nep1-like proteins from plant pathogens: Recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry* 67:1800–1807.
- Goodman**, R.N. e **Novacky**, A.J. (1994). *The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens, A Resistance Phenomenon*. St. Paul, MN: APS Press.
- Gráda**, C. (2006). *Ireland's Great Famine: Interdisciplinary Perspectives*. Dublin: University College Dublin Press, p.7.
- Grant**, M. e **Lamb**, C. (2006) Systemic immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 414–420.
- Griffith**, G.W., Nicholson, J.N., Nenninger, A., Birch, R.N. and Hedger, J.N. (2003) Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *New Zealand J. Bot.* 41, 423–435.
- Gronwald**, J., Plaisance, K., Bailey, B. (2004). Effects of the fungal protein Nep1 and *Pseudomonas syringae* on growth of Canada thistle (*Cirsium arvense*), common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*), and common dandelion (*Taraxacum officinale*). *Weed Science* 52: 98-104.

- Hall, G. e Collin, H.** (1975) "Initiation and Growth of Tissue Cultures of *Theobroma cacao*" *Annals of Botany* 39: 555-570
- Hartmann, T.** (2006). Avaliação das perdas de receita da lavoura cacauera da Bahia provocadas pela introdução da doença da vassoura-de-bruxa.
- Head, B.** (1903). *The Food of the Gods A Popular Account of Cocoa*. London.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. and Williams, P. M.** (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6(10): 986-94.
- Henrissat, B. e Bairoch, A.** (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases *Biochem. J.* 316, 695–696
- Hseu, Y. C., Wu, F. Y., Wu, J. J., Chen, J. Y., Chang, W. H., Lu, F. J., Lai, Y. C., Yang, H. L.** (2005) *Int. Immunopharmacol.* 5, 1914–1925
- ICCO** - International Cocoa Organization – [www.icco.org](http://www.icco.org)
- IPARC** – The International Pesticide Application Research Consortium – [www.dropdata.org/cocoa](http://www.dropdata.org/cocoa)
- Jennings, J.C., Apel-Birkhold, .P.C., Mock, N.M., Baker, C.J., Anderson, J.D. and Bailey, B.A.** (2001) Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep1 from *Fusarium oxysporum*. *Plant Sci.* 161, 891–899.
- Jeong, J. S., Mitchell, T. K. and Dean, R. A.** (2007). "The Magnaporthe grisea snodprot1 homolog, MSP1, is required for virulence." *FEMS Microbiol Lett* 273(2): 157-65.
- Jones JD e Dangl JL** (2006). The plant immune system. *Nature* 444: 323–329
- Kamoun, S., van West, P., de Jong, A. J., de Groot, K. E., Vleeshouwers, V. G. and Govers, F.** (1997). "A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of potato." *Mol Plant Microbe Interact* 10(1): 13-20.
- Kamoun, S., Huitema, E. e Vleeshouwers, V. G.** (1999). "Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response?" *Trends Plant Sci* 4(5): 196-200.
- Kamoun, S.** (2003). "Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes." *Eukaryotic Cell* 2(2): 191-199.
- Kamoun, S.** (2006). "A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes." *Annu Rev Phytopathol* 44: 41-60.

- Kauffmann S**, Legrand M, Geoffroy P, Fritig B. (1987). Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- $\beta$ -glucanase activity. *EMBO Journal* 6: 3209-3212.
- Keates**, S. E., Kostman, T. A., Anderson, J. D., and Bailey, B. A. (2003). Altered gene expression in three plant species in response to treatment with Nep1, a fungal protein that causes necrosis. *Plant Physiol.* 132:1610-1622.
- Kinealy**, C. (1994). *This Great Calamity*, Gill e Macmillan, pp XVI-II, 2-3.
- Klosterman SJ**, Subbarao KV, Kang S, Veronese P, Gold SE, Thomma BP, Chen Z, Henrissat B, Lee YH, Park J, Garcia-Pedrajas MD, Barbara DJ, Anchieta A, de Jonge R, Santhanam P, Maruthachalam K, Atallah Z, Amyotte SG, Paz Z, Inderbitzin P, Hayes RJ, Heiman DI, Young S, Zeng Q, Engels R, Galagan J, Cuomo CA, Dobinson KF, Ma LJ. (2011). Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens. *PLoS Pathog* 7(7)
- Koch**, W., Wagner, C., Seitz, H.U. (1998). Elicitor-induced cell death and phytoalexin synthesis in *Daucus carota* L. *Planta* 206:523-532.
- Kombrink**, E. e **Somssich**, I.E. (1997). Pathogenesis-related proteins and plant defense. In: Carroll G, Tudzynski P, eds. *The Mycota V, Part A. Plant Relationships*. Berlin: Springer Verlag, 107±128.
- Küfner** I, Ottmann C, Oecking C, Nürnberger T. Cytolytic toxins as triggers of plant immune response. (2009) *Plant Signal Behav* 4:977-9.
- Lee**, C. G., Da Silva, C. A., Lee, J. Y., Hartl, D., and Elias, J. A. (2008) *Curr. Opin. Immunol.* 20, 684–689
- Legrand M**, Kauffmann S, Geoffroy P, Fritig B. (1987). Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 84: 6750-6754.
- Leslie**, A. G. W. (1992) Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data, *Joint CCP4 + ESFEMCB Newsletter on Protein Crystallography*, Vol. 26.
- Lindeberg M**, Myers CR, Collmer A, Schneider DJ (2008) Roadmap to new virulence determinants in *Pseudomonas syringae*: insights from comparative genomics and genome organization. *Mol Plant Microbe Interact* 21:685–700.

- Ludvigsen, S. e Poulsen, F. M.** (1992). Three-dimensional structure in solution of barwin, a protein from barley seed. *Biochemistry* 31, 8783–8789
- Maddison, A.C., Marcias, G., Moveira, C., Arias, R. and Neira, R.** (1995). “Cocoa production in Ecuador in relation to dry-season escape from pod rot caused by *Crinipellis pernicioso* and *Moniliophthora roreri*.” *Plant Pathol.* 44, 982–998.
- Mancheño, J.M., Martín-Benito, J., Martínez-Ripoll, M., Gavilanes, J.G, and Hermoso, J.A.** (2003) Crystal and Electron Microscopy Structures of Sticholysin II Actinoporin Reveal Insights into the Mechanism of Membrane Pore Formation, *Structure* 11, 1319-1328.
- Maris AF, Kern AL, Picada JN, Boccardi F, Brendel M, Henriques JA** (2000). Glutathione, but not transcription factor Yap1, is required for carbon source-dependent resistance to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 37(3):175-82.
- Maris AF, Assumpção AL, Bonatto D, Brendel M, Henriques JÁ** (2001). Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. *Curr Genet* 39(3):137-49.
- Mattinen, L., Tshuikina, M., Mae, A., and Pirhonen, M.** (2004). Identification and characterization of Nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:1366-1375.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J.** (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 40, 658–674.
- Meinhardt, L. W., Bellato C., M., Rincones, J., Azevedo, R. A., Cascardo, J. C. and Pereira, G. A.** (2006). "In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*." *Curr Microbiol* 52(3): 191-6.
- Meinhardt LW, Rincones J, Bailey BA, Aime MC, Griffith GW, Zhang D, Pereira GA** (2008). *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? *Mol Plant Pathol* 9(5):577-588.
- Meir, S., Amsellem, Z., Al-Ahmad, H., Safran, E., Gressel, J.** (2009). Transforming a *NEP1* toxin gene into two *Fusarium* spp. to enhance mycoherbicide activity on *Orobanche* – failure and success. *Pest Manag Sci* 65: 588–595.

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento** – [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)

**Mondego**, J.M., Carazzolle, M.F., Costa, G.G., Formighieri, E.F., Parizzi, L.P., Rincones, J., Cotomacci, C., Carraro, D.M., Cunha, A.F., Carrer, H., Vidal, R.O., Estrela, R.C., Garcia, O., Thomazella, D.P., de Oliveira, B.V., Pires, A.B., Rio, M.C., Araujo, M.R., de Moraes, M.H., Castro, L.A., Gramacho, K.P., Goncalves, M.S., Moura Neto, J.P., Goes, N.A., Barbosa, L.V., Gultinan, M.J., Bailey, B.A., Meinhardt, L.W., Cascardo, J.C., Pereira, G.A., (2008). A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into witches' broom disease of cacao. *BMC Genomics* 9: 548.

**Motamayor**, J.C., Risterucci, A.M., Lopez, P.A., Ortiz, C.F., Moreno, A., Lanaud, C. (2002). Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* 89:380-6.

**Motteram**, J., Kufner, I., Deller, S., Brunner, F., Hammond-Kosack, K. E., and Nürnberger, T. (2009) Molecular characterization and functional analysis of MgNLP, the sole NPP1 domain-containing protein, from the fungal wheat leaf pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22, 790–799.

**Mortazavi**, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* 5(7):621-628.

**Nagata** T, Nemoto Y, Hasezawa S (1992) *Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants*. *International Review of Cytology* 132, 1-30

**Nei**, M. e **Rooney**, A.P. (2005). Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet* 39:121-52

**Nimchuk**, Z., Eulgem, T., Holt, B.F., Dangl, J. (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annu Rev Genet.* 37:579-609.

**O'Connell**, R.J. e **Panstruga**, R., 2006. Tête à tête inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytologist* 171: 699–718.

**Orchard**, J., Collin, H. A., Hardwick, K. and Isaac, S. (1994). "Changes in morphology and measurement of cytokinin levels during the development of witches-brooms on cocoa." *Plant Pathology* 43(1): 65-72.

**Otwinowski** Z. e **Minor** W. (1997). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in ...Volume 276: Macromolecular Crystallography, part A, p.307-326

- Ottmann** C, Luberacki B, Kufner I, Koch W, Brunner F, Weyand M, et al. A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. (2009) *Proc Natl Acad Sci USA* 106:10359-64.
- Qutob**, D., Kamoun, S. and Gijzen, M. (2002). "Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy." *Plant Journal* 32(3): 361-373.
- Qutob**, D., Kemmerling, B., Brunner, F., Kufner, I., Engelhardt, S., Gust, A. A., Luberacki, B., Seitz, H. U., Stahl, D., Rauhut, T., Glawischnig, E., Schween, G., Lacombe, B., Watanabe, N., Lam, E., Schlichting, R., Scheel, D., Nau, K., Dodt, G., Hubert, D., Gijzen, M. and Nürnberger, T. (2006). "Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins." *Plant Cell* 18(12): 3721-44.
- Pan**, S. e **Cole**, G. T. (1995). "Molecular and biochemical characterization of a *Coccidioides immitis*-specific antigen." *Infect Immun* 63(10): 3994-4002.
- Pazzagli**, L., Cappugi, G., Manao, G., Camici, G., Santini, A. and Scala, A. (1999). "Purification, characterization, and amino acid sequence of cerato-platanin, a new phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. platani." *J Biol Chem* 274(35): 24959-64.
- Pazzagli**, L., Zoppi, C., Carresi, L., Tiribilli, B., Sbrana, F., Schiff, S., Pertinhez, T. A., Scala, A., and Cappugi, G. (2009) *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 1334–1344.
- Pemberton**, C. L. e **Salmond**, G. P. C. (2004). "The Nep1-like proteins - a growing family of microbial elicitors of plant necrosis." *Molecular Plant Pathology* 5(4): 353-359.
- Pereira**, J. L., deAlmeida, L. C. C. and Santos, S. M. (1996). "Witches' broom disease of cocoa in Bahia: Attempts at eradication and containment." *Crop Protection* 15(8): 743-752.
- Pieterse**, C. M. e **Van Loon**, L. C. (2004). "NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways." *Curr Opin Plant Biol* 7(4): 456-64.
- Pirovani** CP, Carvalho HA, Machado RC, Gomes DS, Alvim FC, Pomella AW, Gramacho KP, Cascardo JC, Pereira GA, Micheli F. (2008). 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(11):2391-2401.
- Purdy**, L. H. e **Schmidt**, R. A. (1996). "Status of cacao witches's broom: biology, epidemiology and management." *Annu Rev Phytopathol* 34: 573-94.

- Ram**, A.; Valle, R.R.; Gardini, E.A. (2004). "Monília do cacauzeiro". São Paulo: Fundação Cargill, 36p.
- Rementería**, A., Lopez-Molina, N., Ludwig, A., Vivanco, A. B., Bikandi, J., Ponton, J. and Garaizar, J. (2005). "Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence." *Rev Iberoam Micol* 22(1): 1-23.
- Rincones**, J., Meinhardt, L. W., Vidal, B. C. and Pereira, G. A. (2003). "Electrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*." *Mycol Res* 107(Pt 4): 452-8.
- Rincones**, J., Mazotti, G. D., Griffith, G. W., Pomela, A., Figueira, A., Leal, G. A., Jr., Queiroz, M. V., Pereira, J. F., Azevedo, R. A., Pereira, G. A. and Meinhardt, L. W. (2006). "Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis perniciosa* from various plant hosts in South America." *Mycol Res* 110(Pt 7): 821-32.
- Rincones**, J., Scarpari, L.M., Carazzolle, M.F., Mondego, J.M.C., Formighieri, E.F., Barau, J.G., Costa, G.G.L., Carraro, D.M., Brentani, H.P., Vilas-Boas, L.A., Oliveira, B., Sabha, M., Dias, R., Cascardo, J.M., Azevedo, R.A., Meinhardt, L.W., Pereira, G.A.G. (2008). Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the Witches' Broom pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *MPMI* 21(7):891-908.
- Rose** JK, Braam J, Fry SC, Nishitani K (2002) *Plant Cell Physiol* 43:1421–1435.
- Ryals**, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. and Hunt, M.D. (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8, 1809–1819.
- Sampedro**, J., e **Cosgrove**, D. J. (2005) *Genome Biol.* 6, 242
- Santos**, R.X.; Melo, S.C.; Cascardo, J.C., Brendel M, Pungartnik C (2008). Carbon source-dependent variation of acquired mutagen resistance of *Moniliophthora perniciosa*: Similarities in natural and artificial systems. *Fungal Genet Biol*
- Seidl**, V., Marchetti, M., Schandl, R., Allmaier, G. and Kubicek, C. P. (2006). "Ep11, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors." *Febs J* 273(18): 4346-59.

- Scala**, L., Pazzagli, C., Comparini, A., Santini, S., Tegli, G., Cappugi, G. (2004) Ceratoplatenin an early-produced protein by *Ceratocystis fimbriata* f. sp. platani elicits phytoalexin synthesis in host and non-host plants, *J. Plant Pathol.* 86: 23–29.
- Scarpari**, L. M., Meinhardt, L. W., Mazzafera, P., Pomella, A. W., Schiavinato, M. A., Cascardo, J. C. and Pereira, G. A. (2005). "Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*." *J Exp Bot* 56(413): 865-77.
- Schouten** A, van Baarlen P, van Kan JAL. (2008). Phytotoxic Nep1-like proteins from the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* associate with membranes and the nucleus of plant cells. *New Phytologist* 177: 493–505.
- Serafini**, M., Bugianesi, R., Maiani, G., Valtuena, S., De Santis, S., Crozier, A. (2003). Plasma antioxidants from chocolate. *Nature* 424, 1013.
- Sheldrick**, G.M. (2007). Sad phasing: basic concepts and high-throughput. *NATO Science Series* 245: 53-65
- Silva**, S. D. V. M. e **Matsuoka**, K. (1999). "Histologia da interação *Crinipellis pernicioso* em cacauzeiros suscetível e resistente a vassoura-de-bruxa." *Fitopatologia Brasileira* 24(1): 54-59.
- Sreenivasan**, T. N. D., S (1989). "Modes of penetration of young cocoa leaves by *Crinipellis pernicioso*." *Plant Disease* 73(6): 478-481.
- Staats**, M., Van Baarlen, P., Schouten, A., and Van Kan, J. 2007. Functional analysis of 24 NLP genes from *Botrytis elliptica*. *Mol. Plant Pathol.* 8:209-214.
- Stahel**, G. (1915). "*Marasmius perniciosus* nov. spec." *Dept Landbouw in Suriname Bull* 33: 1–27.
- Taylor**, M. 1998. "The World Cocoa Situation". International Forum in Cocoa, Lima, Peru, 28-29th October, 1998. LMC International, Ltd., London, UK.
- Tiburcio**, R.A., Costa, G.G., Carazzolle, M.F., Mondego, J.M., Schuster, S.C., Carlson, J.E., Gultinan, M.J., Bailey, B.A., Mieczkowski, P., Meinhardt, L., Pereira, G.A. (2010). Genes acquired by horizontal transfer are potentially involved in the evolution of phytopathogenicity in *Moniliophthora pernicioso* and *Moniliophthora roreri*, two of the major pathogens of cacao. *J Mol Evol* 70(1):85-97.
- The American Phytopathological Society** – APSnet – [www.apsnet.org](http://www.apsnet.org)

**Thomazella**, D. P. T., Teixeira, P. J. P. L., Oliveira, H. C., Saviani, E. E., Rincones, J., Toni, I. M., Reis, O., Garcia, O., Meinhardt, L. W., Salgado, I. and Pereira, G. A. G. (2012), The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. *New Phytologist*, 194: 1025–1034.

**Thomma**, B. P., Penninckx, I. A., Broekaert, W. F. and Cammue, B. P. (2001). "The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*." *Curr Opin Immunol* **13**(1): 63-8.

**Tyler**, B. M., Tripathy, S., Zhang, X., Dehal, P., Jiang, R. H., Aerts, A., Arredondo, F. D., Baxter, L., Bensasson, D., Beynon, J. L., Chapman, J., Damasceno, C. M., Dorrance, A. E., Dou, D., Dickerman, A. W., Dubchak, I. L., Garbelotto, M., Gijzen, M., Gordon, S. G., Govers, F., Grunwald, N. J., Huang, W., Ivors, K. L., Jones, R. W., Kamoun, S., Krampis, K., Lamour, K. H., Lee, M. K., McDonald, W. H., Medina, M., Meijer, H. J., Nordberg, E. K., Maclean, D. J., Ospina-Giraldo, M. D., Morris, P. F., Phuntumart, V., Putnam, N. H., Rash, S., Rose, J. K., Sakihama, Y., Salamov, A. A., Savidor, A., Scheuring, C. F., Smith, B. M., Sobral, B. W., Terry, A., Torto-Alalibo, T. A., Win, J., Xu, Z., Zhang, H., Grigoriev, I. V., Rokhsar, D. S. and Boore, J. L. (2006). "Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis." *Science* 313(5791): 1261-6.

**United Nations Conference on Trade and Development** – [www.unctad.org](http://www.unctad.org)

**Vagin**, A. A., Steiner, R. S., Lebedev, A. A., Potterton, L., McNicholas, S., Long, F., and Murshudov, G. N. (2004) REFMAC5 dictionary: Organisation of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr. D60*, 2284–2295.

**Van der Biezen**, E. A. e **Jones**, J. D. (1998). "Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept." *Trends Biochem. Sci.* 23: 454-456.

**Van Loon**, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T., Conejero, V. (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* 12:245-264.

**Van Loon**, L.C. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103: 753±765.

**Van Loon**, L.C. (1999). Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: Datta SK, Muthukrishnan S, eds. *Pathogenesis-related Proteins in Plants*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1-19.

- Van Loon, L.C. e Van Strien, E.A.** (1999). The families of pathogen-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55, 85-97.
- Vargas WA, Djonovic´ S, Sukno SA & Kenerley CM** (2008) Dimerization controls the activity of fungal elicitors that trigger systemic resistance in plants. *J Biol Chem* 283: 19804–19815.
- Van Wees, S.C., Van der Ent, S. and Pieterse, C.M.** (2008) Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 443–448.
- Veit, S., Worle, J. M., Nürnberger, T., Koch, W. and Seitz, H. U.** (2001). "A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, *Arabidopsis*, and tobacco." *Plant Physiol* 127(3): 832-41.
- Verica JA, Maximova SN, Strem MD, Carlson JE, Bailey BA, Guiltinan MJ,** (2004). Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. *Plant Cell Reports* 23: 404e413.
- Waasmaier, D., e Kirfel, A.** (1995) New Analytical Scattering Factor Functions for Free Atoms and Ions, *Acta Cryst. A* 51.
- Wang, J. Y., Cai, Y., Gou, J. Y., Mao, Y. B., Xu, Y. H., Jiang, W. H. and Chen, X. Y.** (2004). "VdNEP, an elicitor from *Verticillium dahliae*, induces cotton plant wilting." *Appl Environ Microbiol* 70(8): 4989-95.
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M.** (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10(1):57-63.
- Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A., Beer, S.V.** (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 3257(5066):85-8.
- Whitmore, L., e Wallace, B.A.** (2008) Protein Secondary Structure Analyses from Circular Dichroism Spectroscopy: Methods and Reference Databases, *Biopolymers* 89, 392-400.
- Wilson, L. M., Idnurm, A., Howlett, B.J.** (2002). "Characterization of a gene (sp1) encoding a secreted protein from *Leptosphaeria maculans*, the blackleg pathogen of *Brassica napus*." *Molecular Plant Pathology* 3: 487-493.

- Wimley**, WC. (2003). "The versatile beta-barrel membrane protein". *Curr Opin Struct Biol* **13** (4): 404–11.
- Wood**, G.A.R. e Lass, R.A. (1985). *Cocoa*, 4<sup>th</sup> ed. Longman Group Limited, New York.
- Yang** Y, Zhang H, Li G, Li W, Wang X & Song F (2009) Ectopic expression of MgSM1, a Cerato-platanin family protein from Magnaporthe grisea, confers broad-spectrum disease resistance in Arabidopsis. *Plant Biotechnol J* **7**: 763–777.
- Yennawar** NH, Li LC, Dudzinski DM, Tabuchi A, Cosgrove DJ (2006). Crystal structure and activities of EXPB1 (*Zea m 1*), a beta-expansin and group-1 pollen allergen from maize. *PNAS* **103**(40):14664-71.
- Yuan**, J. S., Reed, A., Chen, F. and Stewart, C. N., Jr. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* **7**: 85.
- Zaparoli**, G. (2007) “Uma segunda família de proteínas indutoras de necrose encontrada em *Moniliophthora perniciosa*, causador da doença Vassoura-de-Bruxa em cacauzeiros”. Tese de Mestrado – UNICAMP.
- Zaparoli**, G., Cabrera, O.G., Medrano, F.J., Tiburcio, R., Lacerda, G., Pereira, G.A.G. (2009). Identification of a second family of genes in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches’ broom disease in cacao, encoding necrosis-inducing proteins similar to cerato-platanins. *Mycological Research* **113**: 61-72.
- Zaparoli**, G., Barsottini, M.R.O, de Oliveira, J.F., Dyszy, F., Teixeira, P.J.P.L., Barau, J.G., Garcia, O., Costa-Filho, A.J., Ambrosio, A.L.B., Pereira, G.A.G., Dias, S.M.G. (2011). 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**(45):9901-10.
- Zipfel**, C. (2009) Early molecular events in PAMP-triggered immunity *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 414–420

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "**Caracterização dos mecanismos de ação de duas classes de proteínas indutoras de necrose (CPs e NLPs), presentes em fungos do gênero *Moniliophthora*, patogênicos de cacau**"

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

( X ) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No.2011/03, Instituição: Instituto de Biologia (IB/UNICAMP).

( ) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_

( ) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_

*\* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

  
Aluno: (Gustavo Henrique Alcázar Zapparoli)

  
Orientador: (Gonçalo Amarante Guimarães Pereira)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

  
Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI  
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança  
Instituto de Biologia - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura