

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC
CENTRO DE APOIO MULTIDISCIPLINAR – CAM

PROJETO DE TESE

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE GUARANAZEIRO (*Paullinia
cupana* var. *sorbilis*) E *Fusarium decemcellulare* AGENTE
CAUSAL DO SUPERBROTAMENTO: UMA VISÃO
MORFOANATÔMICA, TRANSCRIPTÔMICA E PROTEÔMICA**

CLAUDIA AFRAS DE QUEIROZ

Manaus - AM

2021

CLAUDIA AFRAS DE QUEIROZ

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE GUARANAZEIRO
(*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) E *Fusarium decemcellulare*
AGENTE CAUSAL DO SUPERBROTAMENTO: UMA VISÃO
MORFOANATÔMICA, E PROTEÔMICA**

Orientador: Dr. Gilvan Ferreira da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Unidade executora

Empresa brasileira de pesquisa agropecuária - EMBRAPA

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Prazo de execução

48 meses

Fontes financiadoras

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Manaus - AM

2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Q3a Queiroz, Claudia Afras de
Análise da interação entre guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) e *Fusarium decemcellulare* agente causal do superbrotamento: uma visão morfoanatômica, transcriptômica e proteômica / Claudia Afras de Queiroz . 2021
127 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Gilvan Ferreira da Silva
Coorientador: Edmar Vaz de Andrade
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Proteômica. 2. Expressão gênica. 3. Superbrotamento. 4. Biossíntese de AIA. I. Silva, Gilvan Ferreira da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

RESUMO

O superbrotamento é uma doença causada pelo fungo *Fusarium decemcellulare* que atinge o guaranazeiro (*Paullinia Cupana* var. *sorbilis*), uma espécie nativa da Amazônia, utilizada amplamente pelas indústrias de bebidas, cosmético e farmacêutica. Entre as doenças que apresentam impacto econômico em guaranazeiro está o superbrotamento que afeta o crescimento e desenvolvimento da planta. Dependendo do tecido afetado, os principais sintomas: são galhas no caule, superbrotamento das gemas vegetativas e superbrotamento das inflorescências. Estes sintomas comprometem a produtividade podendo causar perdas de até 100%. Com o objetivo de identificar e caracterizar as alterações anatômicas, histológicas e moleculares, análises comparativas em tecidos sintomáticos e assintomáticos foram realizadas com base em diferentes abordagens como: microscopia de luz e eletrônica, genômica, transcriptômica e proteômica. As análises morfoanatômicas revelam que os diferentes sintomas apresentam uma redução acentuada no eixo longitudinal e a formação de “cápsulas”, com paredes externas espessas e duras. Quando a infecção afeta as inflorescências também são observados má formação nos órgãos florais com múltiplas flores dentro de uma única flor, baixa diferenciação dos primórdios vegetativos nas gemas vegetativas e surgimento de múltiplos órgãos malformados e um meristema axilar encapsulado por brácteas muito espessadas. Já o agregado de múltiplas cápsulas em um mesmo ponto de ramificação produz o sintoma denominado de galha. Os aspectos morfológicos observados nos sintomas sugerem um possível desequilíbrio hormonal, o que foi corroborado com a análise genômica do patógeno para vias de produção de auxina (AIA) em *F. decemcellulare* e sua posterior confirmação por análises metabolômicas. Os dados comparativos da análise transcriptômica dos três diferentes sintomas da doença são apresentados no capítulo I desta tese. Esses resultados forneceram os primeiros indícios dos mecanismos moleculares de ação do patógeno e as consequências do desequilíbrio hormonal no guaranazeiro. Para melhor compreensão dos mecanismos que desencadeiam a doença em guaranazeiro foi realizada uma análise proteômica comparativa entre tecido doente e sadio. Um total de 3404 proteínas de guaranazeiro foram identificadas, sendo 253 diferencialmente expressas entre as condições. Estes resultados confirmam as observações transcriptômicas e reforçam o papel do desequilíbrio causado pela auxina no superbrotamento. Todas as proteínas do mecanismo SCF (Skp1–Cullin–F-box) de resposta a auxina foram identificadas e a abundância diferencial de alguns componentes do SCF e de proteínas relacionadas a conjugação de AIA no tecido doente reforçam o papel do desequilíbrio no tecido infectado. A análise das proteínas diferencialmente abundantes também sugere a perda da capacidade de regulação da auxina nos tecidos infectados, bem como o aumento da expressão de proteínas relacionadas à biossíntese do ácido gama-aminobutírico (GABA). E em outras espécies de plantas o acúmulo de GABA desencadeia a formação de sintomas semelhantes ao superbrotamento. A análise de proteínas de *F. decemcellulare* expressas durante a interação patógeno-hospedeiro identificou 31 proteínas, entre elas 5 (cinco) correspondem a proteínas efetoras, e uma espermidina sintase que é uma enzima-chave na biossíntese de poliamina, uma molécula relacionada à síntese de GABA.

Palavras-chave: proteômica, expressão gênica, superbrotamento, biossíntese de AIA

ABSTRACT

Oversprouting is a disease caused by the fungus *Fusarium decemcellulare* that affects the guaraná tree (*Paullinia Cupana* var. *sorbilis*), a native Amazonian species, widely used by the soft drinks, cosmetics and pharmaceutical industries. Among the diseases that have an economic impact on guarana is oversprouting that affects plant growth and development, which is characterized by three different symptoms depending on the affected tissue: 1- stem galls, 2- oversprouting of vegetative buds and 3- oversprouting of inflorescences, these symptoms compromise productivity and can cause losses of up to 100%. In order to identify and characterize anatomical, histological and molecular alterations, comparative analyzes in symptomatic and asymptomatic tissues were carried out based on different approaches such as: light and electron microscopy, genomic, transcriptomic and proteomics. The morphoanatomical analyzes reveal that the different symptoms present a marked reduction in the longitudinal axis and the formation of "capsules", with thick and hard outer walls. When the infection affects the inflorescences, extremely malformed floral organs with multiple flowers within a single flower are also observed, and in the vegetative buds the vegetative primordia are poorly differentiated, with the formation of multiple malformed organs and an axillary meristem encapsulated by very thickened bracts. On the other hand, the aggregation of multiple capsules in the same branching point produces the symptom called gall. The morphological aspects observed in the symptoms suggest a possible hormonal imbalance, which was corroborated by the identification in the complete genome of the pathogen of genes for auxin production pathways (AIA) in *F. decemcellulare* and subsequent metabolomic analysis that confirmed the production. These first indications, together with the data of differentially expressed genes in the transcriptome comparing symptomatic and asymptomatic tissues of the three different symptoms of the disease, provided the first indications of the molecular mechanisms of action of the pathogen and the consequences of hormonal imbalance are presented in chapter I of this thesis. For a better understanding of the mechanisms that trigger the disease in guarana, the interaction proteome was also obtained, where 3404 guarana proteins were identified, of which 253 were differentially abundant between diseased and healthy tissue. These results confirm the transcriptomic observations and reinforce the role of the imbalance caused by auxin in oversprouting. All proteins of the SCF mechanism (Skp1–Cullin–F-box) of auxin response were identified and the differential abundance of some SCF components and proteins related to AIA conjugation in diseased tissue reinforce the role of imbalance in infected tissue. Difference in the abundance of proteins such as IAR3, IAGLU and AGO10 that allow greater ability in irreversible conjugation (AIA-Asp and AIA-Glu) and Argo10 related to "downstream" modulation of the auxin response with consequent restoration of hormonal balance are more effective in genotypes with higher level of resistance.

Keyword: proteomics, gene expression, oversprouting, IAA biosynthesis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação gráfica do funcionamento do mecanismo SCF. (Mockaitis et. al., 2008) 14
- Figura 2** - Complexo de superbrotamento em guaranazeiro. **A-** Hiperplasia e hipertrofia das inflorescências; **B-** Hiperplasia e hipertrofia do botão vegetativo; **C** - Galhas de cápsulas do tecido reprodutivo (galhas com aspecto de flor); **D** - Galhas de cápsulas de botões vegetativos 18
- Figura 3** - Flores de guaranazeiro. **A-** flor sadia. **B-** flor com sintoma superbrotamento, classificado neste trabalho como estágio 1 da doença. **C-D** - flores de guaranazeiro com sintoma de superbrotamento, tecido em estágio de necrose, classificado neste trabalho como estágio 2 da doença 23
- Figura 4** - Flores da planta de guaraná. **A-** esquerda: inflorescência com tamanho reduzido e sintoma de superbrotamento; à direita: inflorescência sadia de tamanho normal. **B-** imagem ampliada mostrando aspecto das inflorescências infectadas por *F. decemcellulare*. **C** - flor sintomática apresentando estruturas florais deformadas. **D - F** -Inflorescências de flor sadia, com estruturas normais 27
- Figura 5** - Estruturas de flores assintomáticas de guaranazeiro. **A-B-** estruturas da flor feminina. **A-** flor feminina, com pétalas frontais retiradas, para expor os estaminódios que são vistos à frente do ovário e do estilete (stl) que suporta o estigma trífido (stg) exposto sobre a corola (p: pétala). **B-** pétalas e sépalas foram removidas para expor o ovário (ov) funcional da flor feminina. Estigma trífido e estilete naturalmente alongado na flor feminina estão sobre o ovário. **C-** bráctea petalóide (faces interna e externa), que ocorre uma vez em cada flor. **D-** pétalas foliáceas que ocorrem em número de quatro, por flor, em vistas da face interna e externa. Vista interna expõe a escama (**D**, lado esquerdo). **E-G-** estruturas da flor masculina. **E-** os filetes dos estames funcionais (f) são mais longos que aqueles dos estaminódios e expõem as anteras funcionais deiscuentes (a), sobre a corola das flores masculinas. Estilete está ausente e o estigma rudimentar não fica exposto sobre a corola da flor masculina. **F-** sépala e pétalas, alguns estames e o rudimento de estigma foram removidos para expor o restante dos oito estames e anteras funcionais. Os estames e uma pétala removidos em **F** podem ser observados em **G**, assim como o estigma rudimentar (stg) da flor masculina. (a: antera f: filamento, stl: estilo; stg: estigma; ov: ovário; p: pétala) 28
- Figura 6** - Flores de guaranazeiro assintomáticas e com sintomas de superbrotamento. **A-C-** flor funcionalmente masculina assintomática, após a antese, em vista do pólo apical (**A**), em corte transversal superficial (**B**), e em vista lateral sem corte (**C**), para observação do comprimento do eixo longitudinal. **D-F-** estrutura reprodutiva sintomática, com formação de cápsula de tecidos espessados (linha 29

vermelha indica a espessura do envoltório da cápsula) e pilosidade acentuada, em vista apical (**D**), em corte transversal superficial (**E**) e em vista lateral sem corte (**F**), para observação do comprimento do eixo longitudinal. O corte transversal superficial (**E**) expõe a espessura da “cápsula” e múltiplos conjuntos de verticilos reprodutivos malformados, resquícios de pistilos, amarelados, e vários conjuntos de filetes, brancos e achatados dorsoventralmente. **G-I**- detalhes das cápsulas **G**- corte corado com Azul de Toluidina. **H-I**- eletromicrografias de varredura de cortes transversais de estruturas reprodutivas sintomáticas. **J-K**- detalhes de flores assintomáticas em eletromicrografia de varredura. Linhas vermelhas indicam a espessura do envoltório das cápsulas, formadas provavelmente pelo espessamento das sépalas. Compare-se com a espessura das sépalas assintomáticas indicadas pelas linhas amarelas

Figura 7 - Detalhes das estruturas encontradas no interior de cápsulas nas inflorescências de guaranazeiro com sintomas de superbrotamento. **A**- cápsula em corte transversal superficial. **B-D**- detalhes das estruturas observadas em **A**. **B**- filetes encurtados suportando anteras pouco diferenciadas (em branco) em torno de um reminescente de ovário malformado (amarelado), em vista anterior e posterior. **C**- estrutura semelhante a um ovário, com vários lóculos malformados e não perfeitamente fundidos, bastante semelhante à estrutura em **B** embora neste último caso, os filetes e anteras circunscritos não tenham sido observados. **D**- filetes muito encurtados e brancos suportando anteras malformadas, com as tecas separadas por uma cavidade, sendo que neste caso, os reminescentes do gineceu não foram identificados. **E-H** - outras estruturas observadas no interior de cápsulas presentes em inflorescências sintomáticas. **E**- vista apical de pistilo em corte transversal, com quatro lóbulos de estigma (stg) encurtados e sésseis. **F**- cortes transversais de ovários com quatro lóculos (lo) observados no interior de “cápsula” em inflorescência sintomática e com três lóculos de uma flor assintomática, para comparação. **G**- pelo menos onze filetes de anteras, com coloração branca brilhante podem ser vistos circundando o pistilo de cor amarelada, com seis carpelos não fundidos. **H**- estigma (stg) sésseis, pouco alongado e sem papilas estigmáticas, inserido quase que diretamente sobre o ovário (ov), resultante do encurtamento extremo do estilete

Figura 8 - Gemas vegetativas em ramos assintomáticos e com sintomas de superbrotamento no guaranazeiro. **A** - gema vegetativa axilar assintomática em processo de diferenciação, com eixo longitudinal maior que o transversal. **B** - gema vegetativa sintomática, apresentando redução do eixo longitudinal e aumento do eixo transversal, com organização de brácteas em séries concêntricas, em um mesmo plano do eixo longitudinal que não se alonga normalmente. **C** - corte transversal de um ponto de ramificação, em planta assintomática, com ramo secundário muito jovem (1) e gema axilar protegida por brácteas foliáceas (2). **D** e **E** - cápsulas observadas em ramo sintomático em corte transversal, com uma profusão de órgãos malformados e um meristema axilar encapsulado (1) pelas brácteas muito espessadas (círculo amarelo). **F** e **I** - cortes longitudinais de cápsulas retiradas de ramos sintomáticos. **G** - ramo primário jovem assintomático, em corte transversal. **H**

31

33

- ramo primário jovem em planta sintomática, com espessamento do córtex. **J-K** - extremidades apicais de ramos de guaranazeiro. As barras brancas indicam os planos de corte para a visualização das estruturas internas, apresentadas à direita da figura. Os asteriscos indicam as superfícies dos ramos principais. **J** - ramo assintomático de guaranazeiro apresentando ramificação secundária oriunda do alongamento normal das gemas em dois nós e mais duas brotações apicais. **K** - ramo de guaranazeiro com sintomas de superbrotamento, apresentando cápsulas em cinco nós e entrenós muito reduzidos

Figura 9 - Galhas no ramo principal de guaranazeiro. **A-D** - proliferação de cápsula de gemas vegetativas reunidas em um nó de ramificação. **A e B** – galhas em plantas jovens. **C e D** – galhas em plantas adultas. **E-H** – Cacho de cápsulas durante a formação inicial das galhas em planta jovem de viveiro. **E** - pelo menos nove cápsulas podem ser contadas em um único ponto de ramificação da planta. **F** - corte longitudinal da estrutura em **E**, evidenciando cerca de cinco cápsulas, é um tipo de tecido conector basal (BC), que faz a conexão das cápsulas entre si e com o ramo da planta afetada, formando a galha. **G** - ramo menos afetado de planta jovem, com pelo menos quatro cápsulas justapostas consecutivamente e não lado a lado. **H** - corte longitudinal da estrutura em **G** mostrando o tecido conector basal. **I-L** - Sintomas de superbrotamento em ramos de mudas de viveiro. **I**: “cápsula” vista externamente, linha vermelha indica o plano do corte transversal apresentado em **K**. **J** - a mesma cápsula, visto de cima para mostrar a espessura da camada externa circundante e a presença de órgãos mal diferenciados e malformados **L** - corte histológico da mesma “cápsula”, corado com azul de toluidina. (*) Espaço de ar dentro da “cápsula”. As setas vermelhas indicam a camada externa das cápsulas, que provavelmente são brácteas extremamente espessas. Os círculos indicam possíveis meristemas independentes e malformados

Figura 10 - Termos GO dos (top 50) associados a anotação funcional para os genes diferencialmente expressos em tecidos doentes de guaranazeiro (Componente celular) 37

Figura 11 - Termos GO dos (top 50) associados a anotação funcional para os genes diferencialmente expressos em tecidos doentes de guaranazeiro (Processo biológico) 38

Figura 12 - Termos GO dos (top 50) associados a anotação funcional para os genes diferencialmente expressos em tecidos doentes de guaranazeiro (Função molecular) 38

Figura 13 - Genes diferencialmente expressos no tecido com sintomas de superbrotamento. Esquerda: STRING rede de componentes do complexo SCF (Skp1-Cul1Fbox) e alguns genes a jusante. Direito: Expressão diferencial (foldchange ≥ 2 e FDR $\leq 0,05$) de componentes do complexo SCF e alguns genes a jusante. Letras em negrito indicam genes diferencialmente expressos 39

- Figura 14** - Gel SDS-PAGE corados com Comassie *blue* R-350 mostrando seleção de proteínas das três condições: flor sadia, flor doente estágio 1 e flor doente estágio 2. As faixas (1-14) selecionadas para recorte são indicadas à esquerda pelas linhas pontilhadas. As amostras de cada condição foram aplicadas no gel em triplicadas. Foram utilizados 15 µg de extrato protéico em cada poço 40
- Figura 15** - Detecção de ácido indol-3-acético (IAA) por UPLC-QTOF-MSE. **A** - Cromatograma em modo de íon negativo Full Scan (m/z 120–1180 Da). **B** - íon extraído (m/z 174,05). Os tempos de retenção do composto são: (**A**) 5,29 min para o padrão analítico (IAA de origem vegetal) e 5,34 min para *Fusarium decemcellulare* (CML 3423). (**B**) 5,30 min para o padrão analítico e *F. decemcellulare* (CML 3423) 42
- Figura 16** - Dados de espectro de massa para a molécula do precursor do ácido indol-3-acético (IAA) (m/z 174,05) e produto (m/z 130) para o padrão analítico, de origem vegetal, e *F. decemcellulare* CML 3423 analisados no negativo- modo de íons 42
- Figura 17** – Flores de guaranazeiro. A – Flor sadia assintomática. B – Flor doente com sintomas de superbrotamento 51
- Figura 18** – Flores de guaranazeiro do clone 375. Esquema representando a coleta do material vegetal das flores doentes e flores sadias 52
- Figura 19** – Isolamento de *F. decemcellulare*. **A** – fragmentos de flores de guaranazeiro após assepsia para isolamento. **B** – culturas crescida em meio ágar-água após 3 dias, marcação para retirada de fragmentos para o repique em meio BDA. **C** – culturas com morfologia de *F. decemcellulare* crescida em meio BDA para esporulação. **D** – visualização através do microscópio de macroconídeos de *F. decemcellulare*, confirmando a presença do fungo no tecido doente 52
- Figura 20** – Perfil proteômico das amostras analisadas. **A** - o gráfico de caixa que representa os dados proteômico antes e depois da normalização. **B** – números de proteínas por condição experimental 58
- Figura 21** – *Heatmap* da correlação de Pearson entre as amostras das diferentes condições analisadas 59
- Figura 22** – Proteínas diferencialmente expressas entre as condições de flor sadia e flor doente de guaranazeiro. A - *Heatmap* das 253 proteínas dos clones 375, 613 e 626 de guaranazeiro. B - *Volcano plot* destacando as proteínas significativas entre as duas condições 61
- Figura 23** – Representação da classificação funcional da função molecular e sua distribuição de acordo com anotação do *Gene Ontology* das proteínas diferencialmente expressas de flor doente de guaranazeiro 62

Figura 24 – Representação da classificação funcional no processo biológico e sua distribuição de acordo com anotação do <i>Gene Ontology</i> das proteínas diferencialmente expressas em flor doente de guaranazeiro	63
Figura 25 – Proteínas relacionadas ao ciclo celular diferencialmente abundantes em flor doente de guaranazeiro. A - Análise de redes moleculares dessas proteínas B - Heatmap das proteínas relacionadas ao ciclo celular diferencialmente abundante em flor doente	64
Figura 26 - Representação da classificação funcional do componente celular e sua distribuição de acordo com anotação do <i>Gene Ontology</i> das proteínas diferencialmente expressas de flor doente em guaranazeiro	66
Figura 27 – <i>Heatmap</i> das proteínas diferencialmente expressas relacionadas aos hormônios vegetal	67
Figura 28 – <i>Heatmap</i> das proteínas relacionadas à síntese e catabolismo de poliaminas e GABA (a esquerda). E a direita, esquema da biossíntese de GABA a partir do catabolismo de poliaminas e metabolismo do de glutamato. As proteínas escritas em vermelho representam as proteínas identificadas neste trabalho	71
Figura 29 - <i>Heatmap</i> das proteínas relacionadas à biossíntese de compostos fenólicos, e síntese de terpeno	72
Figura 30 – Esquema da biossíntese de compostos fenólicos a partir de fenilalanina. As enzimas marcadas em vermelho foram identificadas neste estudo. Fonte: Taiz e Zeiger (2013).	74
Figura 31 - <i>Heatmap</i> das proteínas relacionadas a peroxidases identificadas no proteoma	75
Figura 32 - Análise de redes moleculares das 31 proteínas de <i>F. decemcellulare</i> identificadas em flor doente de guaranazeiro	77
Figura 33 - Representação da classificação funcional da função molecular e sua distribuição de acordo com o <i>Gene Ontology</i> das proteínas de <i>F. decemcellulare</i> em tecidos com superbrotamento em guaranazeiro	78
Figura 34 – Representação da classificação funcional do processo biológico e sua distribuição de acordo com o <i>Gene Ontology</i> das proteínas de <i>F. decemcellulare</i> em tecidos com superbrotamento em guaranazeiro	79
Figura 35 - Representação da classificação funcional da componente celular e sua distribuição de acordo com o <i>Gene Ontology</i> das proteínas de <i>F. decemcellulare</i> em tecidos com superbrotamento em guaranazeiro	79

Figura 36 – <i>Heatmap</i> das proteínas preditas efetores em <i>F. decemcellulare</i>	81
Figura 37 – <i>Heatmap</i> das 31 proteínas de <i>F. decemcellulare</i> identificadas na interação de tecido de flores com superbrotamento	83

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - <i>reads</i> mapeadas no transcriptoma <i>de novo</i> de tecido sintomático e assintomático de guaranazeiro	36
Tabela 2 - Peptídeos mapeados e quantidade de proteínas identificadas nos tecidos floral sintomático e assintomático de diferentes genótipos de guaranazeiro (<i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i>)	59
Tabela 3 – Listas das proteínas relacionadas ao ciclo celular diferencialmente abundantes em flor doente de guaranazeiro	64
Tabela 4 - Relação de proteínas identificadas da interação que compõe o mecanismo SCF	68
Tabela 5 - Peptídeos mapeados e quantidade de proteínas identificadas de <i>F. decemcellulare</i> no tecido floral sintomático de diferentes genótipos de guaranazeiro (<i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i>)	76

LISTA DE APÊNDICE

Apêndice A - Genes diferencialmente expressos envolvidos no processo metabólico de hormônios vegetais	108
Apêndice B - Géis SDS PAGE demonstrando o perfil proteico entre tecidos sadios e tecido doente de guaranazeiro. A- extrato de proteínas de guaranazeiro de flores sadia; B – extrato de proteínas de flores doente de guaranazeiro. Foram utilizados 15 µg de extrato proteico em cada poço	114
Apêndice C - Proteínas diferencialmente expressas entre as condições de flor sadia e flor doente de guaranazeiro	115
Apêndice D - Proteínas diferencialmente abundantes em tecido floral doente de guaranazeiro	116

ANEXO I

Anexo I - Protocolo de extração de proteínas método SDS-Fenol	122
--	-----

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO GERAL	16
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
CAPÍTULO I	17
Caracterização morfoanatômica e molecular dos sintomas de superbrotamento causado por <i>Fusarium decemcellulare</i> em guaranazeiro (<i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i>)	17
4. Material e métodos	18
4.1 Material vegetal	18
4.2 Estudo Anatômico	18
4.3 Estudo Histológico	19
4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	20
4.5 Isolamento de <i>Fusarium decemcellulare</i>	20
4.6 Expressão diferencial por RNA-Seq e dados proteômicos de tecidos sintomáticos e assintomáticos	20
4.7 Extração e análise de RNA-Seq	21
4.8 Análise Proteômica	22
4.9 Detecção IAA secretada por <i>F. decemcellulare</i>	25
5. RESULTADOS	27
5.1 Germinação excessiva de órgãos reprodutivos	27
5.2 Superbrotamento de tecido vegetativo	32
5.3 Galhas no ramo principal	34
5.4 Expressão diferencial em tecido sintomático e assintomático	35
5.5 Detecção de IAA secretado por <i>Fusarium decemcellulare</i>	41
6. DISCUSSÃO	43
CAPÍTULO II	49
Identificação de proteínas diferencialmente abundantes entre tecidos florais assintomático e com sintomas de superbrotamento causado por <i>Fusarium decemcellulare</i> em guaranazeiro (<i>Paullinia cupana</i> var <i>sorbilis</i>)	49
8. MATERIAL E MÉTODOS	50
8.1 Material vegetal	50
8.2 Obtenção do extrato protéico	53
8.3 Quantificação das proteínas	53
8.4 SDS-PAGE	53
8.5 Digestão das amostras	54
8.6 Espectrometria de massas	54

8.7 Pesquisa de banco de dados	55
8.8 Identificação de proteínas	56
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
9.1 Proteínas do guaranazeiro	57
9.2 Proteínas diferencialmente abundantes	60
9.3 Identificação das proteínas diferencialmente abundantes relacionadas a hormônios vegetais	66
9.4 – Proteínas relacionadas à síntese e catabolismo de Poliaminas	69
9.5 Metabólitos secundários responsivos à infecção	72
9.6 Identificação das proteínas de <i>Fusarium decemcellulare</i> expressas durante a interação	76
10. CONCLUSÃO	84
11. REFERENCIAS	86
Apêndice A	108
Genes diferencialmente expressos envolvidos no processo metabólico de hormônios vegetais	108
Apêndice B	114
Géis SDS PAGE demonstrando o perfil proteico entre tecidos sadios e tecido doente de guaranazeiro. A- extrato de proteínas de guaranazeiro de flores sadia; B – extrato de proteínas de flores doente de guaranazeiro. Foram utilizados 15 µg de extrato proteico em cada poço	114
Apêndice C	115
Proteínas relacionadas a proliferação celular	115
Apêndice D	116
Proteínas diferencialmente abundantes em tecido floral doente de guaranazeiro	116
Anexo I	122
Protocolo de extração de proteínas método SDS-Fenol (SOUZA et al., 2014)	122

1. INTRODUÇÃO

Paullinia Cupana Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke é uma espécie poliplóide da família Sapindaceae (Freitas et al. 2007), popularmente conhecida como guaranazeiro. O guaranazeiro é uma planta nativa da floresta amazônica e suas sementes são processadas para a produção do pó ou do xarope de guaraná, apreciados principalmente por suas propriedades medicinais e estimulantes (Duke et al. 2002; Schimpl et al. 2013). As sementes de guaraná contêm 2,5 a 6% de cafeína, destacando-se entre os alcalóides por sua aplicação em diversos produtos industriais (Heckman et al. 2010; Schimpl et al. 2013). Seu potencial é notório já que uma variedade de produtos à base de guaraná é amplamente comercializada como refrigerantes, bebidas energéticas, suplementos nutricionais, produtos naturais para perda de peso e formulações cosméticas e farmacêuticas (Majhenic et al. 2007; Hamerski et al. 2013).

O Brasil é o único grande produtor global de guaraná, atendendo aos mercados nacional e internacional. Aproximadamente 70% da produção é destinada à indústria de refrigerantes, o restante é comercializado na forma de xarope, bastão, pó e extrato para consumo interno e exportação (Atroch 2002; Kuri 2008). Essas diferentes aplicações fazem do guaraná um importante produto agrícola e justificam o esforço contínuo de pesquisas para apoiar seu cultivo. As plantas de guaraná são cultivadas principalmente nos estados da Bahia e Amazonas (Nascimento Filho e Atroch, 2002; CONAB 2019).

O clima amazônico, por apresentar uma grande umidade e temperatura elevadas, favorece o desenvolvimento de doenças que afetam a produtividade e a comercialização do guaraná na região, sendo que os danos e incidência variam de acordo com o agente causal. Nesse contexto, uma das doenças que afetam o guaraná é o superbrotamento, causado pelo fungo *Fusarium decemcellulare* Brick (teleomorfo *Albonectria rigidiuscula*) e destaca-se entre as doenças que reduzem a produtividade no Estado do Amazonas (Araújo et al. 2006) pois acomete ramos e inflorescências desde mudas até plantas adultas e pode comprometer até 100% da produtividade. A eclosão de gemas vegetativas em novos ramos ou inflorescências consiste em brotações sucessivas ao longo dos ramos em pontos muito próximos entre si impactando diretamente a produção de guaraná (Araújo et al. 2006).

O *Fusarium decemcellulare* já foi relatado como agente causal em mais de 88 plantas hospedeiras (Farr e Rossman 2021). Na fruta bilimbi (*Averrhoa bilimbi* L.), os sintomas são de brotação da inflorescência, com inchaço e conseqüente ressecamento dos caules florais, o que leva à queda prematura de flores e frutos (Bastos e Santos 2001). Na árvore do cacau (*Theobroma cacao* L.) a doença é chamada de galha-das-flores, que consiste em galhas nos botões vegetativos e florais e brotação excessiva, que podem estar presentes tanto no tronco quanto nos galhos das plantas (Lawrence et al. 1991; Vicente et al. 2012). Relatos que descrevem a formação de galhas e proliferação excessiva de ramos provenientes de gemas apicais ou axilares com internódios curtos também são comuns na mangueira (*Mangifera indica* L.), (Ângulo e Ângulo e Villapudua 1982; Ploetz et al. 1996). Recentemente, a proliferação excessiva da inflorescência causada por *F. decemcellulare* foi observada em cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) (Matos et al. 2016). O superbrotamento, malformação vegetativa ou floral e sintomas de galhas estão relacionados ao desequilíbrio hormonal causado por vários organismos, como bactérias, fungos, nematóides e insetos (Suzuki et al. 2014; Guimarães et al. 2015; Kuzmanović et al. 2018; Kaur e Kaur 2018; Gheysen e Mitchum 2019). Dados transcriptômicos e proteômicos de tecidos sintomáticos identificaram genes relacionados a fitohormônios ou proteínas diferencialmente expressas associadas à biossíntese ou responsivas a diferentes hormônios (Teixeira et al. 2014; Bailey et al. 2015; Liu et al. 2016; Liu et al. 2017). A importância da auxina na proliferação celular já é bem descrita em vários estudos. Acredita-se que a auxina seja essencial desde a primeira divisão zigótica, bem como a sua distribuição em toda planta. Relata-se que alterações na distribuição e localização de auxina podem modificar o crescimento diferencial entre as células, impactando na morfologia dos órgãos e em sua organogênese alterando assim a arquitetura geral da planta (Weijers e Jurgens 2005; Leyser, 2006; Scheres e Xu 2006; Teale et al., 2006).

Os níveis normais de auxina na planta são controlados pela síntese e degradação enzimática via oxidação do AIA e pelas peroxidases presentes nos tecidos vegetais. A correta distribuição e regulação de auxina na planta são essenciais para funcionamento de vários processos de desenvolvimentos,

influenciando diretamente a expressão gênica (Goda et al., 2004; Nemhauser et al., 2006; Overvoorde et al., 2005; Tian et al., 2002; Schneider e Wightman; Mockaitis et. al., 2008). A variação na concentração de AIA como resultado de infecção tem sido relatado em diversas interações. Com o uso de estratégias diferentes, os patógenos possuem a habilidade de provocar o desequilíbrio hormonal no hospedeiro aumentando ou diminuindo os níveis de auxina, interferindo nos mecanismos associados à regulação transcricional de auxinas como os fatores de resposta mediado pelas proteínas repressoras auxina/AIA (Aux/AIA), os fatores de resposta à auxina (ARF) e as proteínas associadas à inibição da resposta SCF (TIR1/AFB) – F box.

Estudos anteriores descrevem duas famílias de reguladores transcricionais que participam na rota de sinalização da auxina, os fatores de resposta a auxina (Arf) e proteínas AUX/AIA (Li, Si-Bei 2016; Roosjen 2018; Powers, 2020). Os fatores de respostas a auxina são proteínas nucleares que se ligam com especificidade aos elementos de resposta à auxina (AuxREs). Essa ligação resulta na ativação ou repressão da transcrição de genes dependendo do tipo de ARF envolvida. As proteínas AUX/AIA são importantes reguladores secundários da expressão gênica induzida por auxina, regulando indiretamente a transcrição pela ligação à proteína ARF. Se a ARF em questão for um ativador transcricional, o efeito da AUX/AIA é reprimir a transcrição, agora se a ARF for um repressor transcricional, a AUX/AIA atua como um ativador (Reed, 2001; Guilfoyle e Hagen, 2007).

Outro mecanismo bastante utilizado pelas plantas é o complexo SCF (SKP1, CUL1 e proteína F-box), que exercem uma função importante na regulação da abundância de proteínas, catalisando a adição de ubiquitina a moléculas de proteínas destinadas à degradação proteolítica, em um processo dependente de ATP (Roosjen 2018; Powers, 2020).

O complexo SCF é composto pelas seguintes proteínas: uma proteína central CUL 1, associada a uma proteína adaptadora SKP1. Essa por sua vez possui um local de ligação para terceira proteína F-box que funciona como o componente de ligação ao substrato do SCF. A quarta subunidade denominada RBX1, ROC ou Hrt1, se liga o Ub-E2 e promove a transferência de

ubiquitina para o substrato ligado a proteína F-box, marcando esse substrato para posterior degradação proteolítica (Smalle e Vierstra 2004; Petroski e Deshaies 2005). Análises em mutantes de *Arabidopsis* levaram a identificação de uma proteína F-box a TIR 1. A TIR 1 é um componente do complexo SCF^{TIR1} necessário para a sinalização da auxina na célula. A função do complexo SCF^{TIR1} é marcar reguladores transcricionais constitutivamente expressos, de genes induzidos por auxinas, com cadeias de proteínas de ubiquitina, destinando-os a degradação no proteossomo. A proteína TIR1 liga-se diretamente a auxina e essa ligação promove a associação do complexo SCF^{TIR1} com a proteína AUX/IAA, promovendo a degradação dessa proteína (Figura 1), (Ruegger et al., 1998; Gray et al., 1999; Dharmasiri et al., 2005; Kepinski et al., 2005). Entre as proteínas que regulam a atividade do mecanismo SCF está a proteína RUB que apresenta um papel importante na montagem e desmontagem do SCF (Petroski e Deshaies, 2005; Wu et al., 2006). O RUB é conjugado com a subunidade Cullin do SCF, essa conjugação pode ser desfeita pelo complexo COP9 (CNS), a modificação da molécula RUB é importante para o recrutamento de Ub-E2 para SCF, além disso o RUB parece bloquear a ligação da CUL pela CAND1, permitindo a interação CUL-SKP1 (Wei e Deng, 2003; Kerscher et al., 2006).

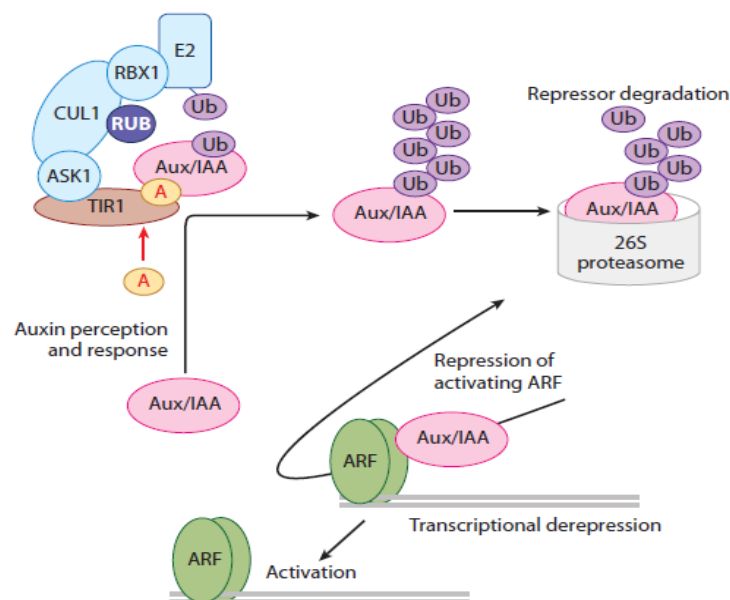


Figura 1 – Representação gráfica do funcionamento do mecanismo SCF. (Mockaitis et. al., 2008)

Durante a interação do patógeno-hospedeiro, espécies patogênicas do gênero *Fusarium* são capazes de produzir três dos principais hormônios vegetais (auxinas, citocininas e giberelinas) e a capacidade de produzir cada um deles varia entre diferentes espécies de *Fusarium* (Vrabka et al. 2018). Algumas espécies de *Fusarium*, tal como *F. proliferatum* e *F. delphinoides* já foram descritas com a capacidade de produzir auxina (Chung et al. 2003; Le Floch et al. 2003; Maor et al. 2004; Tsavkelova et al. 2012; Kulkarni et al. 2013; Yin et al. 2014). No entanto, estudos recentes indicam que o tecido infectado é mais afetado pelo *status* de auxina (forma livre ou conjugado) do que a quantidade total produzida (Niehaus et al. 2016; Vrabka et al. 2018). A infecção em plantas de *A. thaliana* por *Botrytis cinerea* Pers. e *Pseudomonas Syringae* induz a ativação transcricional de enzimas codificadas pelo GH3 genes, e essas enzimas promovem a conjugação do ácido indol-3-acético (IAA) com os aminoácidos ou açúcar. Conjugados de IAA com aspartato (Asp) e glutamato (Glu), ao contrário de outros aminoácidos, não seriam quebrados para produzir moléculas de IAA livres e aminoácidos nas reações de reciclagem de auxina subsequentes, resultando em níveis irreversíveis mais baixos de atividade de auxina (González-Lamothe et al. 2012).

Muitas espécies do gênero *Fusarium*, incluindo diversos patógenos de plantas são hábeis produtores de IAA (Tsavkelova et al 2012; Kulkarni et al 2013). Análises baseadas no genoma e transcriptoma de *F. decemcellulare* têm indicado a presença de diferentes *clusters* de genes para a produção de hormônios vegetais como: giberelina, etileno e diferentes vias para produção de auxina (IAA), reforçando a hipótese descrita anteriormente (Lobo 2016).

Neste contexto, este estudo visa analisar a regulação de genes e vias metabólicas relacionadas à produção de fitormônios pelo patógeno e identificar por meio de uma análise proteômica os possíveis mecanismos moleculares relacionados à interação entre *Fusarium decemcellulare* e guaranazeiro. Os resultados deste trabalho contribuirão tanto para elucidar as causas do superbrotamento, quanto para a identificação de estratégias de controle da doença e em conjunto, estes resultados podem diretamente ser aplicados ao melhoramento genético do guaranazeiro e de outras espécies afetadas por este patógeno.

2. OBJETIVO GERAL

Analisar a interação entre guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) e *Fusarium decemcellulare* visando identificação dos mecanismos moleculares que desencadeiam os sintomas da doença.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 – Analisar a morfoanatomia dos três diferentes sintomas de superbrotamento em guaranazeiro;

2 – Identificar genes diferencialmente expressos entre tecidos de guaranazeiro sintomáticos e assintomáticos;

3 – Identificar proteínas diferencialmente abundantes em tecidos de guaranazeiro sintomáticos e assintomáticos;

4 – Identificar possíveis mecanismos moleculares relacionados à doença.

CAPÍTULO I

Caracterização morfoanatômica e molecular dos sintomas de superbrotamento causado por *Fusarium decemcellulare* em guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)

Publicado no periódico *Tropical Plant Biology* em 12 maio de 2020

Morpho-Anatomical and Molecular Characterization of the Oversprouting Symptoms Caused by *Fusarium decemcellulare* in Guarana Plants (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)

Doi: <https://doi.org/10.1007/s12042-020-09256-1>

4. Material e métodos

4.1 Material vegetal

Tecidos de guaranazeiro com e sem sintomas de superbrotamento (inflorescências, gemas vegetativas e galhas) foram coletados no campo Experimental da Embrapa da Amazônia Ocidental (02 ° 52 ' Sul e 59 ° 59 ' Oeste), localizado na cidade de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. Os tecidos foram coletados em diferentes estádios de desenvolvimento, tecidos de plantas jovens de viveiros e tecidos de plantas adultas do campo, incluindo plantas de clones CMA 500 e CMA 504 (Figura 2).



Figura 2 - Complexo de superbrotamento em guaranazeiro. **A-** Hiperplasia e hipertrofia das inflorescências; **B-** Hiperplasia e hipertrofia do botão vegetativo; **C** - Galhas de cápsulas do tecido reprodutivo (galhas com aspecto de flor); **D** - Galhas de cápsulas de botões vegetativos

4.2 Estudo Anatômico

Amostras de tecidos saudáveis e tecidos com sintomas de superbrotamento foram fragmentadas e imediatamente fixadas em FAA (formaldeído 10%, ácido acético 10% e álcool 30% em água destilada). O

material foi mantido em geladeira até a dissecação para análise anatômica externa e interna. Uma vez removido do fixador, o material vegetal foi imerso em ácido acético 1,3 a 2,0%, durante a dissecação, para evitar o escurecimento natural devido à oxidação fenólica. Os cortes para expor as estruturas internas foram feitos com lâminas de barbear. As estruturas dissecadas foram fixadas em ágar-carvão para facilitar a visualização dos detalhes e aumentar o contraste. Por conta disso, o fundo preto das fotografias foi corrigido manualmente para eliminar o reflexo da luz do microscópio estereoscópico trinocular na superfície do ágar-carvão. As imagens foram capturadas em ocular para câmera digital DCE-1 (equipamento LF) acoplada ao terceiro tubo ocular. As barras de escala que indicam o tamanho das estruturas nas imagens foram produzidas fotografando uma escala milimétrica com as mesmas configurações usadas para capturar as imagens.

4.3 Estudo Histológico

Amostras de tecidos saudáveis e tecidos com sintomas de superbrotamento (inflorescência, botões vegetativos e galões) foram fixadas em FAA por até 48h e transferidas para etanol 50%, no qual fragmentos mais finos foram imersos por 30 min e fragmentos mais grossos por 4 - 8h. Os cortes foram desidratados em uma série de soluções de etanol (50, 70, 85, 100 e 100%) por 1, 2, 4, 4 e 4h, respectivamente (SASS, 1958). Em seguida, o material foi transferido para butanol-clorofórmio (3:1) e embebido em parafina em 55 - 60°C. O material infiltrado foi colocado em um molde de papel formando um pequeno bloco que foi seccionado em micrótomo em cortes longitudinais e transversais (10 - 18µm). Lâminas contendo as seções foram transferidas para xileno para remover a cera de parafina, imediatamente movidas para uma série de etanol (100, 95, 70, 50 e 30%) por 3 min cada diluição, coradas com corante azul Toluidina (O' Brien et al. 1964), séries de diluições de etanol e novamente em xileno. Lâminas permanentes foram montadas com bálsamo do Canadá. Cortes histológicos foram feitos em tecidos vegetais e lâminas preparadas com corante Lactophenol Cotton Blue para observação da colonização do patógeno. O

material foi analisado e fotografado em microscópio óptico Zeiss Axio Imager M.2 acoplado a câmera digital AxioCam MRc.

4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras foram coletadas e fixadas em Karnovsky tamponado com fosfato (Karnovsky 1965), pós-fixada em tetróxido de ósmio tamponado com fosfato a 1%. Após três lavagens de 10 min em água destilada, as amostras foram desidratadas em 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, séries de etanol 100% (15 min em cada estágio) e três mudanças em etanol 100% em temperatura ambiente. O etanol foi então substituído por dióxido de carbono líquido e as amostras foram secas usando o aparelho de secagem de ponto crítico EMS 850. Eles foram então montados em suportes, revestidos com platina e observados em um Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss 940A, sob aceleração de voltagem de 15KV.

4.5 Isolamento de *Fusarium decemcellulare*

O isolamento direto foi realizado a partir do micélio observado na inflorescência da planta do guaraná e na superfície dos botões vegetativos com sintomas de brotação. O micélio foi transferido para o meio *Potato Dextrose Agar* (PDA). O isolamento indireto foi realizado a partir de fragmentos de tecido vegetal esterilizado na superfície (etanol 70%, hipoclorito de sódio 2,5% e água destilada) que foram transferidos para o meio PDA. As placas de ambos os métodos de isolamento foram mantidas a 25 °C com fotoperíodo de 12h por três dias. Culturas com morfologia típica *F. decemcellulare* foram transferidos para meio *Synthetic Nutrientpoor Agar* (SNA) para obter culturas monospóricas (Summerell et al. 2003; Leslie e Summerell 2006).

4.6 Expressão diferencial por RNA-Seq e dados proteômicos de tecidos sintomáticos e assintomáticos

Devido à ausência de protocolo de inoculação artificial para *F. decemcellulare* em plantas de guaraná, neste trabalho os dados moleculares de RNA-Seq e Proteômica foram obtidos de tecidos sintomáticos e assintomáticos coletados no mesmo estágio de desenvolvimento da planta em condições de campo na Embrapa Amazônia Ocidental. Para o proteoma, foram coletadas da mesma planta flores saudáveis e sintomáticas em dois estágios da doença, estágio 1 (flores com aspectos iniciais de brotação) e em estágio 2 (flores com sinais avançados de doença incluindo escurecimento do tecido) (Figura 3). Para confirmar a ausência do patógeno em tecidos saudáveis e assegurar sua presença nos tecidos doentes, todos os tecidos utilizados neste estudo foram submetidos ao isolamento do *Fusarium decemcellulare* realizada conforme descrito por Batista e Bolkan (1982).

4.7 Extração e análise de RNA-Seq

Após a excisão, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido seguido do isolamento do RNA. O isolamento do RNA foi conduzido como Morante-Carriel et al. (2014), usando 1g de tecido por amostra. O Life Sciences Core Facility (LaCTAD) da Universidade Estadual de Campinas realizou a preparação da biblioteca e o sequenciamento de cada amostra.

As *reads* obtidas foram submetidas a uma etapa de controle de qualidade utilizando Trimmomatic-0.33 (Bolger et al. 2014), FastQC v0.11.3 (Andrews 2010) e SortMeRNA v.1.99 beta (Kopylova et al. 2012) para remover qualquer rRNA residual. *Reads* mapeadas para o genoma de *Fusarium decemcellulare* foram descartados, e uma montagem do transcriptoma *de novo* foi realizada por Trinity v.2.2.0 (Grabherr et al. 2011). O mapeamento de leitura para o transcriptoma *de novo* foi realizado usando TopHat2 v2.0.9 (Kim et al. 2013). Contagens de *reads*, normalização e cálculo de expressão diferencial (*fold-change* ≥ 2 e taxa de descoberta falsa - FDR $\leq 0,05$) foi realizada pelo pacote Cufflinks v2.1.1 (Trapnell et al. 2010). A análise de expressão diferencial foi realizada comparando tecidos sintomáticos e assintomáticos, considerando três repetições biológicas de cada condição. Genes responsivos à auxina foram pesquisados em genes diferencialmente expressos após anotação funcional por

Blast2GO (Conesa et al. 2005) e DAVID v6.8 (Huang et al. 2009) e os dados de expressão foram usados pelo pacote CummeRbund no ambiente R.

4.8 Análise Proteômica

Para a extração da proteína total, foram utilizadas três réplicas biológicas do tecido floral assintomático e sintomático estádios 1 (flores com aspectos iniciais de brotação) e 2 (flores com sinais avançados de doença incluindo escurecimento do tecido) (Figura 3), de acordo com a respectiva ausência e presença de *F. decemcellulare*. Dois gramas do tecido vegetal foram utilizados seguindo o protocolo SDS-Fenol descrito por Souza et al. (2014). Uma alíquota do sedimento obtido foi ressuspensa em 500 µL de tampão de solubilização (ureia 8 M; tioureia 2 M; SDS a 10%). A amostra foi usada para quantificação de proteína total com o *kit* Qubit™ (Invitrogen™) de acordo com as instruções do fabricante e a absorbância foi determinada em um Fluorômetro Qubit® Modelo 3.0. Após a dosagem, 15 µg de proteína total de cada condição (tecido saudável, tecido doente de estágio 1 e tecido doente de estágio 2 em três réplicas biológicas cada) foram analisados por SDS-PAGE 12% em tampão TrisGlicina 1X pH 8,3 (Tris 0,025 M; glicina 0,192 M; 0,1% SDS) sob uma tensão de 250V e uma corrente constante de 50 mA. Para visualização, o gel foi incubado em azul Comassie coloidal (8% de sulfato de amônio; 0,8% de ácido fosfórico; 0,08% de azul de Comassie G-250; 20% de metanol) por 2h o excesso de corante foi removido com água deionizada durante a noite. As bandas de proteínas das diferentes condições (tecido saudável, tecido doente estádios 1 e 2) das três réplicas biológicas foram separadas por bandas considerando a intensidade e excisadas manualmente com auxílio de um bisturi e de um transiluminador de luz branca (Figura 14).



Figura 3 - Flores de guaranazeiro. **A-** flor sadia. **B-** flor com sintoma superbrotamento, classificado neste trabalho como estágio 1 da doença. **C-D** - flores de guaranazeiro com sintoma de superbrotamento, tecido em estágio de necrose, classificado neste trabalho como estágio 2 da doença

As bandas de proteína excisadas foram submetidas a digestão das amostras que consistiu em descoloração e remoção do SDS do gel com uma solução contendo 50 % de metanol e 2,5 % de ácido acético em água ultrapura, seguida da redução (10 mM de ditioneitol por 30 min em temperatura ambiente), alquilação (50 mM de iodoacetamida por 30 min em temperatura ambiente mantido no escuro), digestão com tripsina (Promega) e extração dos peptídeos (HANNA et al., 2000, modificado). Em seguida, foi aliquotado 1 % de ácido fórmico, seguida da dessalinização. Após digestão, as amostras foram liofilizadas, e armazenadas a -20 °C até a realização das análises.

A aquisição dos espectros e o processamento dos dados gerados foram realizados no Laboratório de Espectrometria de Massas e Workstation, do Laboratório Nacional de Biociências – LNBio, no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron - LNLS, Campinas – SP, coordenado pela Dra. Adriana Franco Paes Leme com a supervisão da Dra. Bianca Alves Pauletti.

Em seguida, as amostras biológicas para cada condição experimental foram obtidas e 4,5 µL automaticamente injetado em uma coluna *trapping Symmetry C18* (180 µm × 20 mm) para dessalinização de peptídeo a uma taxa de fluxo de 5 µL/min durante 2 min. Os peptídeos foram separados em C18 (100 µm × 100 mm) RP-nanoUPLC (nanoAcquity, Waters) acoplado a um espectrômetro de massa Q-ToF Premier (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) com fonte de *nanospray* ESI a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min. O gradiente foi 2 - 90% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico ao longo de 45 min. O instrumento foi operado no '*top three*', no qual um espectro de MS é adquirido seguido por MS / MS dos três picos mais intensos detectados.

Os espectros resultantes foram processados usando Mascot Distiller 2.2.1.0, 2008, Matrix Science (MassLynx V4.1) e pesquisados contra Uniprot Plantar banco de dados (42.268 proteínas e 16.292.130 peptídeos, outubro / 2018) e Uniprot Fungi (34.274 proteínas e 16.794.773 peptídeos, outubro /2018) e banco de dados do genoma de *F. decemcellulare*, transcriptoma de *F. decemcellulare*, transcriptoma da interação e transcriptoma do guaraná disponível em (<http://www.lmb.cnptia.embrapa.br/tools/Fusariumdecemcellulare/>). As pesquisas foram realizadas com carbamidometilação como modificação fixa, oxidação de

metionina como modificação variável, uma clivagem perdida de tripsina e uma tolerância de 0,1 Da para íons precursores e fragmentos.

4.9 Detecção IAA secretada por *F. decemcellulare*

Para testar a habilidade de *F. decemcellulare* de produzir auxina, a cepa Fdc CML3423 foi testada. Esta cepa foi recuperada de inflorescências de plantas de guaraná com sintomas de brotação da região de Maués, estado do Amazonas, depositadas na Coleção Micológica da Embrapa Amazônia Ocidental (CPAA) e na Coleção Micológica de Lavras (CML 3423). A cepa foi cultivada em 75 mL de meio MS de triptofano (1 g K₂HPO₄, 0,4 g MgSO₄, 0,2 g NaCl e 0,003 g CuSO₄, 1,5 mg/mL - 1 triptofano, 1,5 mg/mL - 1 glicose, pH 7) durante 15 dias a 25 ° C sob agitação (180 rpm). Após o crescimento, o meio foi separado do micélio fúngico por filtração usando papel de filtro, e alíquotas de 50 mL do meio MS foram coletadas e liofilizadas.

O método de extração do IAA foi utilizado pela primeira vez por Chiwocha et al. (2003) e modificado por Turecková et al. (2009) Para este estudo, usamos uma versão adaptada do método descrito por Tureckova. Resumidamente, 50 mg de meio MS liofilizado foram extraídos com 750 µL solução de metanol: água: ácido acético (10:89:1; v/v/v) durante 1h a 4 °C.

O solvente foi posteriormente recuperado com uma seringa e o procedimento foi realizado novamente com o mesmo material nas mesmas condições, mas com 30 min de incubação. Ambos os extratos foram combinados e filtrados em membrana de PTFE 0,20 µm × 13 mm (Merck, Millipore, Irlanda) para prevenir partículas. O filtrado foi submetido a extração em fase sólida (SPE) utilizando cartucho C18 (100 mg, 3 mL, Phenomenex). Antes da introdução do extrato, o cartucho foi condicionado com 2 mL de metanol e calibrado com 2 mL de solução de metanol: água: ácido acético (10:89:1; v/v/v). O extrato foi então aplicado no sistema SPE, e após essa etapa, o cartucho foi lavado com 1 mL de solução de metanol: água: ácido acético (10:89:1; v/v/v) para remover interferências. O extrato foi eluído com 3 mL de metanol: água: ácido acético (80:19:1).

O eluido foi seco sob uma corrente suave de nitrogênio e recuperado com 300µL solução de metanol:água (30:70; v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico, filtrada por meio de membrana de PTFE 0,20 µm × 13 mm (Merck, Millipore, Irlanda), o extrato final foi analisado por cromatografia líquida.

As análises foram realizadas utilizando cromatografia líquida de ultraeficiência (UPLC) acoplada a um analisador *Time-of-flight* (TOF), espectrômetro de massa *Waters Micromass* LCT equipado com interface de electrospray (ESI). As separações foram feitas usando uma coluna C18 (*Waters Acquity UPLC C18*, 2,1 mm x 150 mm, 1,7 µm). Os perfis dos metabólitos dos extratos foram obtidos inicialmente por um gradiente exploratório de fase móvel composto da fase A (água com 0,1 % v/v ácido fórmico) e fase B (acetonitrila com 0,1 % v/v ácido fórmico). As amostras foram submetidas a um gradiente exploratório 5-95 % com taxa de fluxo de 500µL min⁻¹. As análises de cada extrato foram realizadas no modo de ionização negativa (NI) em intervalo de 100 - 1200 Da, com o tempo de aquisição de 0,1 s no modo centróide. As condições ESI foram definidas da seguinte forma: Tensão capilar 2800 V, tensão do cone 40 V, temperatura da fonte 120° C, temperatura de dessolvatação 330° C, fluxo de gás cone 20L h⁻¹, fluxo de gás de dessolvatação 600L h⁻¹, e MCP (voltagem da placa do microcanal) - detector 1900 V (Chiwocha et al. 2003; Matsuda et al. 2005).

5. RESULTADOS

5.1 Germinação excessiva de órgãos reprodutivos

Visando uma melhor demonstração das alterações morfológicas causadas pelo superbrotamento, foi realizada a descrição anatômica de flores saudáveis (Figura 4 A direita, D, E e F), e doentes (Figura 4 A esquerda, B, C). O guaranazeiro apresenta flores funcionalmente unissexuais masculinas e femininas sobre a mesma ráquis de inflorescência. No entanto, a espécie desenvolveu um mecanismo de assincronia de floradas em que cada tipo de flor fica aberta e apta para cruzamentos durante ciclos alternados e sucessivos de três a quatro dias. Por isto, dificilmente são observadas simultaneamente flores masculinas e femininas abertas durante um mesmo ciclo de três há quatro dias em uma mesma raque ou ramo da planta, o que favorece a alogamia.

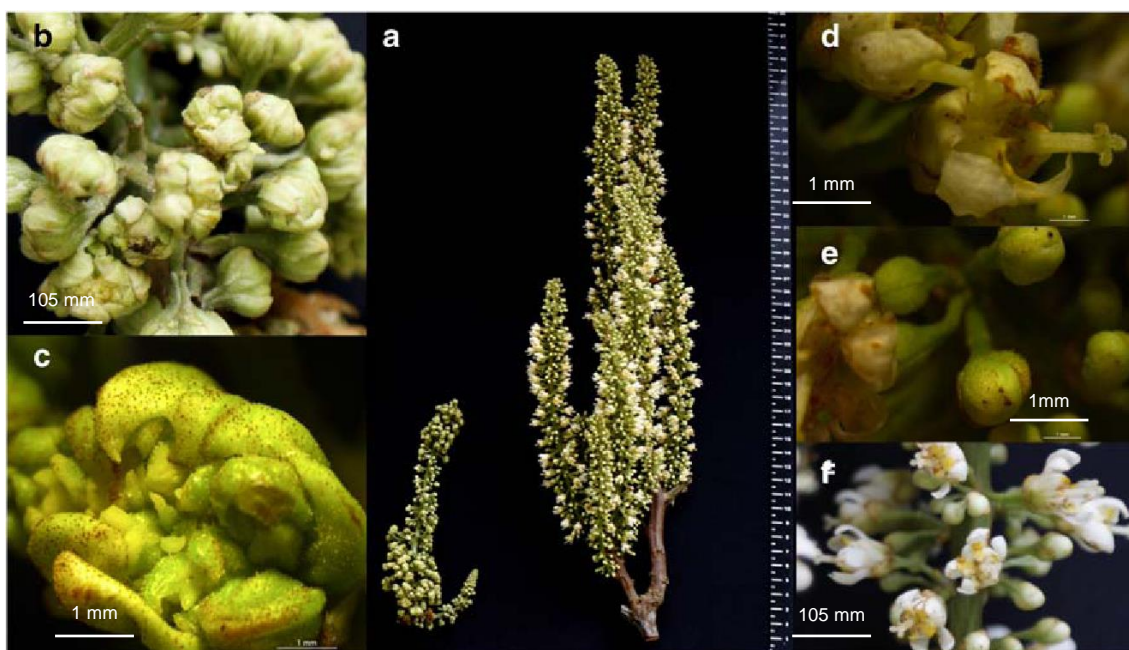


Figura 4 - Flores da planta de guaraná. **A**- esquerda: inflorescência com tamanho reduzido e sintoma de superbrotamento; à direita: inflorescência sadia de tamanho normal. **B**- imagem ampliada mostrando aspecto das inflorescências infectadas por *F. decemcellulare*. **C** - flor sintomática apresentando estruturas florais deformadas. **D - F** -Inflorescências de flor sadia, com estruturas normais

As flores femininas assintomáticas de guaranazeiro apresentam ovário súpero, estilete mais longo que o estigma, que é trífido e fica exposto

sobre a corola (Figura 5 A e B). Oito estaminódios não funcionais (a, anteras indeiscentes; f, filete do estaminódio na Figura 5 A) ocupam o lugar dos estames e não são visíveis acima da corola da flor feminina. Flores masculinas assintomáticas apresentam oito estames funcionais (Figuras 5 E e F), com filetes mais longos que os dos estaminódios na flor feminina, que por isto expõem as anteras sobre a corola. Circundado pelos estames funcionais fica o gineceu não funcional, representado por um rudimento de estigma (Figura 5 G). Uma das cinco sépalas é modificada e algumas vezes classificada como bráctea (Figura 5 C) e as outras quatro são mais espessas e pilosas que as pétalas e de coloração verde. As pétalas são foliáceas, bastante frágeis, sendo todas elas muito alvas (a coloração avermelhada das pétalas na Figura 9 deve-se ao processo de oxidação natural, acelerado pela exposição dos tecidos fixados ao ar), e apresentam escamas internas (Figura 5 D).

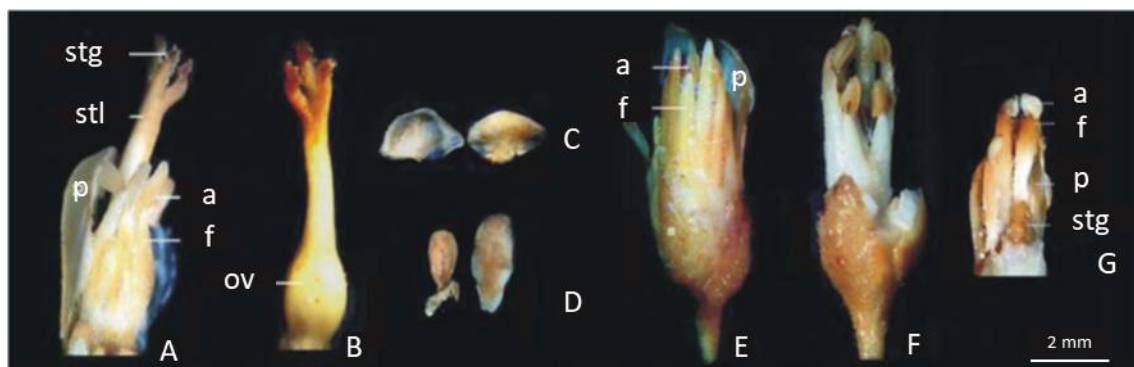


Figura 5 - Estruturas de flores assintomáticas de guaranazeiro. **A-B**- estruturas da flor feminina. **A**- flor feminina, com pétalas frontais retiradas, para expor os estaminódios que são vistos à frente do ovário e do estilete (stl) que suporta o estigma trífido (stg) exposto sobre a corola (p: pétala). **B**- pétalas e sépalas foram removidas para expor o ovário (ov) funcional da flor feminina. Estigma trífido e estilete naturalmente alongado na flor feminina estão sobre o ovário. **C**- bráctea petalóide (faces interna e externa), que ocorre uma vez em cada flor. **D**- pétalas foliáceas que ocorrem em número de quatro, por flor, em vistas da face interna e externa. Vista interna expõe a escama (**D**, lado esquerdo). **E-G**- estruturas da flor masculina. **E**- os filetes dos estames funcionais (f) são mais longos que aqueles dos estaminódios e expõem as anteras funcionais deiscentes (a), sobre a corola das flores masculinas. Estilete está ausente e o estigma rudimentar não fica exposto sobre a corola da flor masculina. **F**- sépala e pétalas, alguns estames e o rudimento de estigma foram removidos para expor o restante dos oito estames e anteras funcionais. Os estames e uma pétala

removidos em **F** podem ser observados em **G**, assim como o estigma rudimentar (stg) da flor masculina. (a: antera f: filamento, stl: estilo; stg: estigma; ov: ovário; p: pétala)

Nas inflorescências com sintomas de superbrotamento, ocorre a formação de cápsulas com paredes extremamente espessadas, que impedem a antese das flores e a exposição dos verticilos reprodutivos (Figura 6 D a F). O espessamento dos verticilos vegetativos (sépalas e pétalas) das flores sintomáticas pode ser observado quando são comparados os cortes transversais de flores assintomáticas (Figura 6 B e J-K) e sintomáticas (Figura 6 E e G-I). O número de camadas de células, o tamanho das células e aparentemente a espessura das paredes celulares estão aumentados nos tecidos sintomáticos (Figura 6 I vs 10K).

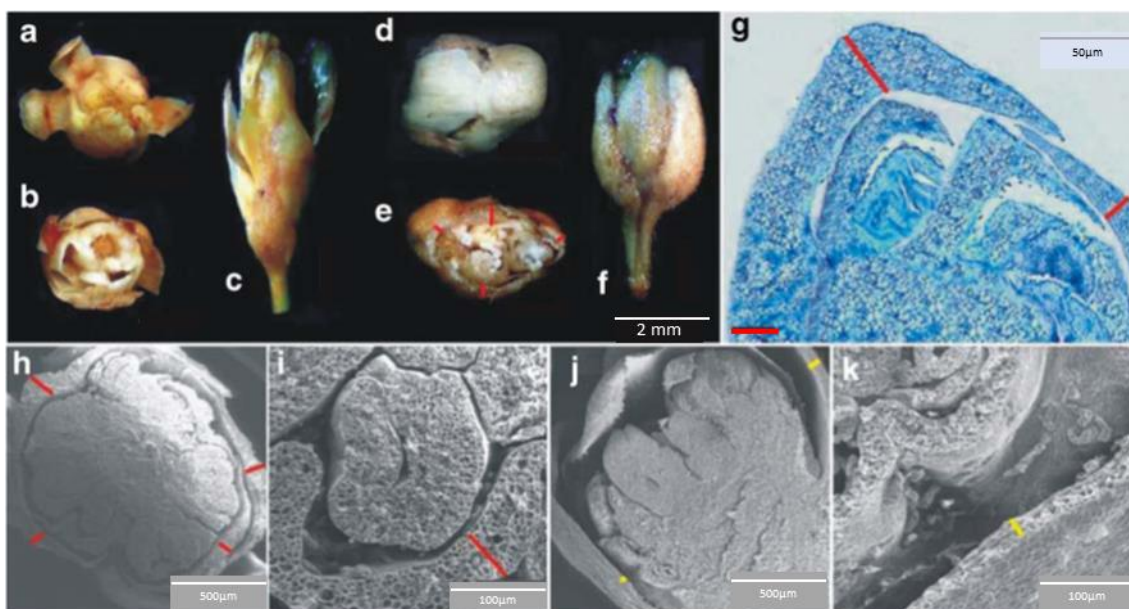


Figura 6 - Flores de guarazeiro assintomáticas e com sintomas de superbrotamento. **A-C**- flor funcionalmente masculina assintomática, após a antese, em vista do pólo apical (**A**), em corte transversal superficial (**B**), e em vista lateral sem corte (**C**), para observação do comprimento do eixo longitudinal. **D-F**- estrutura reprodutiva sintomática, com formação de cápsula de tecidos espessados (linha vermelha indica a espessura do envoltório da cápsula) e pilosidade acentuada, em vista apical (**D**), em corte transversal superficial (**E**) e em vista lateral sem corte (**F**), para observação do comprimento do eixo longitudinal. O corte transversal superficial (**E**) expõe a espessura da “cápsula” e múltiplos conjuntos de verticilos reprodutivos malformados, resquícios de pistilos, amarelados, e vários conjuntos de filetes, brancos e achatados dorso ventralmente. **G-I**- detalhes das cápsulas **G**- corte corado com Azul de Toluidina. **H-I**- eletromicrografias de varredura de cortes transversais de estruturas

reprodutivas sintomáticas. **J-K**- detalhes de flores assintomáticas em eletromicrografia de varredura. Linhas vermelhas indicam a espessura do envoltório das cápsulas, formadas provavelmente pelo espessamento das sépalas. Compare-se com a espessura das sépalas assintomáticas indicadas pelas linhas amarelas

Aparentemente, são principalmente as sépalas que compõem o envoltório mais externo das cápsulas. No interior das cápsulas, há certa compartimentalização, e conjuntos de verticilos reprodutivos malformados são contidos pelo que seriam conjuntos de pétalas também malformadas, encurtadas e anormalmente espessas. Há mais de dois conjuntos de verticilos reprodutivos mal formados dentro de cada cápsula, ao contrário do que se verifica nas flores assintomáticas onde é possível identificar um conjunto de verticilos reprodutivos funcionais e um conjunto de verticilos rudimentares, masculino ou feminino, dependendo da funcionalidade da flor (Figuras 7 e 7 B vs 7 E e 7 A-D). O número de componentes de cada verticilo também é anormal, invariavelmente, a ponto de não ser possível definir qual a funcionalidade da flor(es) dentro das cápsulas nas inflorescências sintomáticas. Estruturas reprodutivas sintomáticas com rudimentos de dois pistilos e dois conjuntos de estruturas reminiscentes de androceus, todos extremamente mal formados dentro de uma única cápsula foram frequentemente encontrados (Figura 7). Rudimentos de pistilos com estigmas fendidos em quatro superfícies (Figura 7 E) em vez das três encontradas em flores assintomáticas (Figura 7 A e B), e ovários com quatro lóculos (lo) em vez de três (Figura 7 F) foram observados. E até mesmo onze filetes circundando um pistilo com seis carpelos não fundidos (Figura 7 G) também foram encontrados dentro das cápsulas em estruturas reprodutivas sintomáticas.

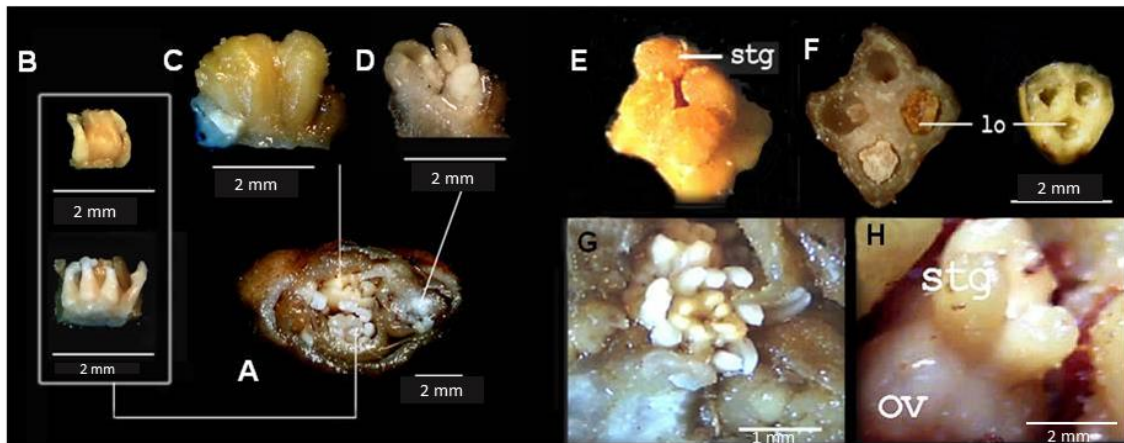


Figura 7 - Detalhes das estruturas encontradas no interior de cápsulas nas inflorescências de guaranazeiro com sintomas de superbrotingamento. **A**- cápsula em corte transversal superficial. **B-D**- detalhes das estruturas observadas em **A**. **B**- filetes encurtados suportando anteras pouco diferenciadas (em branco) em torno de um reminescente de ovário malformado (amarelado), em vista anterior e posterior. **C**- estrutura semelhante a um ovário, com vários lóculos malformados e não perfeitamente fundidos, bastante semelhante à estrutura em **B** embora neste último caso, os filetes e anteras circunscritos não tenham sido observados. **D**- filetes muito encurtados e brancos suportando anteras malformadas, com as tecas separadas por uma cavidade, sendo que neste caso, os reminescentes do gineceu não foram identificados. **E-H** - outras estruturas observadas no interior de cápsulas presentes em inflorescências sintomáticas. **E**- vista apical de pistilo em corte transversal, com quatro lóbulos de estigma (stg) encurtados e sésseis. **F**- cortes transversais de ovários com quatro lóculos (lo) observados no interior de “cápsula” em inflorescência sintomática e com três lóculos de uma flor assintomática, para comparação. **G**- pelo menos onze filetes de anteras, com coloração branca brilhante podem ser vistos circundando o pistilo de cor amarelada, com seis carpelos não fundidos. **H**- estigma (stg) sésseis, pouco alongado e sem papilas estigmáticas, inserido quase que diretamente sobre o ovário (ov), resultante do encurtamento extremo do estilete

Outro aspecto bem característico da infecção é a redução do eixo longitudinal das estruturas florais sintomáticas (Figura 6 C vs F). O encurtamento das estruturas reprodutivas acompanha o encurtamento generalizado das cápsulas com relação às flores normais: estigmas sésseis (stg) (Figura 7 E e H) foram observados algumas vezes, em lugar de estarem implantados sobre os estiletes alongados (stl) característicos de flores assintomáticas (Figura 5 A e B). Os lóbulos dos estigmas, quando os estigmas podem ser observados, também se apresentam encurtados (Figuras 6 E e H) e com diâmetro aumentado.

5.2 Superbrotamento de tecido vegetativo

Nas gemas vegetativas em ramos de guaranazeiro, observa-se os mesmos efeitos de encurtamento do eixo longitudinal, aparecimento de cápsulas com paredes espessadas, que estão em órgãos vegetativos provavelmente compostas de brácteas anormais que de outra forma protegeria os botões vegetativos em ramos assintomáticos. O comprimento dos entrenós dos ramos é claramente comprometido (Figura 8).

As cápsulas de tecido vegetativo contêm os meristemas e órgãos malformados que não se alongaram para produzir ramificações secundárias e folhas. O alongamento dos internódios dos ramos sintomáticos está claramente prejudicado (Figura 8 J vs 8 K). Especificamente no espécimen dissecado para este estudo, apesar dos entrenós estarem muito curtos em toda a extensão do ápice do ramo, as gemas dos nós mais apicais ainda produziram alguns ramos secundários com alongamento normal.

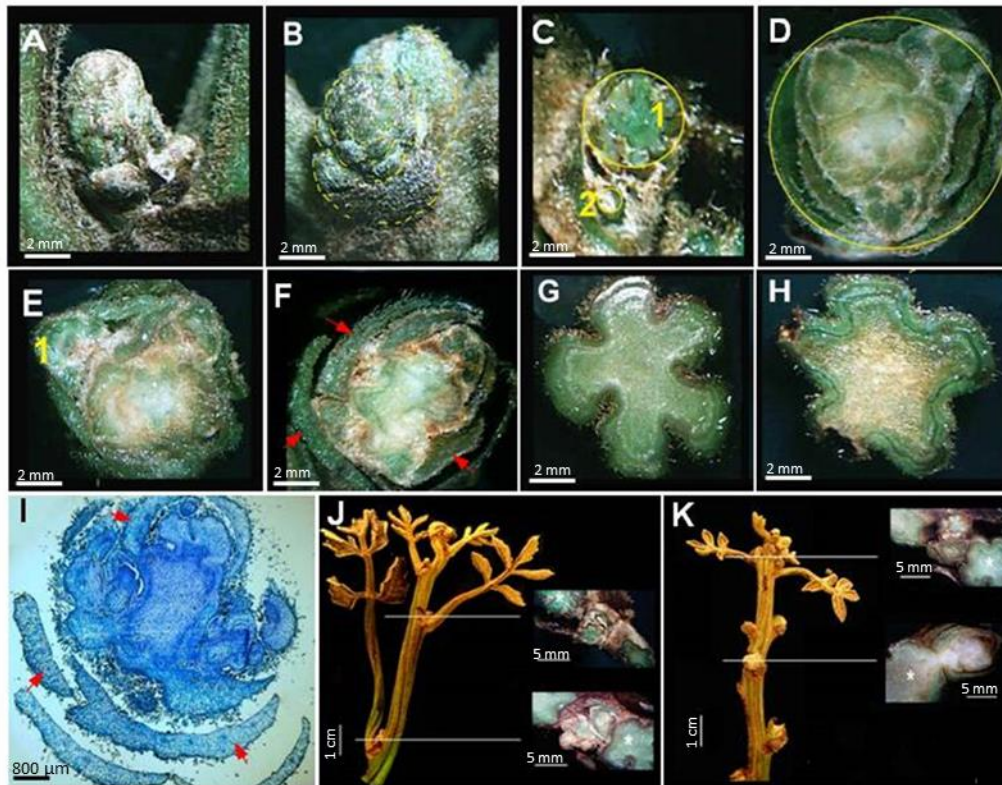


Figura 8 - Gemas vegetativas em ramos assintomáticos e com sintomas de superbrotamento no guaranazeiro. **A** - gema vegetativa axilar assintomática em processo de diferenciação, com eixo longitudinal maior que o transversal. **B** - gema vegetativa sintomática, apresentando redução do eixo longitudinal e aumento do eixo transversal, com organização de brácteas em séries concêntricas, em um mesmo plano do eixo longitudinal que não se alonga normalmente. **C** - corte transversal de um ponto de ramificação, em planta assintomática, com ramo secundário muito jovem (1) e gema axilar protegida por brácteas foliáceas (2). **D** e **E** - cápsulas observadas em ramo sintomático em corte transversal, com uma profusão de órgãos malformados e um meristema axilar encapsulado (1) pelas brácteas muito espessadas (círculo amarelo). **F** e **I** - cortes longitudinais de cápsulas retiradas de ramos sintomáticos. **G** - ramo primário jovem assintomático, em corte transversal. **H** - ramo primário jovem em planta sintomática, com espessamento do córtex. **J-K** - extremidades apicais de ramos de guaranazeiro. As barras brancas indicam os planos de corte para a visualização das estruturas internas, apresentadas à direita da figura. Os asteriscos indicam as superfícies dos ramos principais. **J** - ramo assintomático de guaranazeiro apresentando ramificação secundária oriunda do alongamento normal das gemas em dois nós e mais duas brotações apicais. **K** - ramo de guaranazeiro com sintomas de superbrotamento, apresentando cápsulas em cinco nós e entrenós muito reduzidos

As estruturas na Figura 8 J mostram o processo de ramificação em planta assintomática, onde há diferenciação de meristemas de pelo menos uma gema por nó, originando os ramos secundários. Detalhes na Figura 8 K são cortes transversais dos ramos principais e cápsulas nas mesmas imagens e os planos de corte são indicados por finas linhas brancas. O acúmulo de estruturas não diferenciadas e malformadas e núcleos meristemáticos dentro da parede espessa das cápsulas é evidente (Figura 8 D, E, F, I e K).

5.3 Galhas no ramo principal

Em plantas em que a infecção evolui para a formação de aglomerados de cápsulas nos ramos principais, o sintoma de superbrotamento assemelha-se a um tumor no caule, formando as galhas. Dependendo da idade da planta e do tempo de desenvolvimento dos sintomas, podem ser observados dois tipos de galhas com base nas diferenças da morfologia externa das cápsulas (Figura 9 A e B).

No interior das cápsulas que compõem as galhas, observadas em corte longitudinal em mudas de viveiro, ocorrem sucessões de gemas malformadas prejudicadas em sua diferenciação, mas que não apresentam sinais de amolecimento, apodrecimento ou escurecimento e assim se mantêm por longos períodos. Nesta fase da infecção, as várias cápsulas que compõem as galhas estão conectadas a um tecido basal comum (BC na Figura 9 F e H), que está preso à planta no ponto de ocorrência de um nó ou ponto de ramificação, mas não se observa mais alongamento de entrenós ou diferenciação de ramos secundários ou folhas saindo das cápsulas nas galhas (Figura 9 A e C). É possível observar, a espessura aumentada do envoltório externo das cápsulas nos tecidos vegetativos sintomáticos, que neste caso parece ser constituído de brácteas extremamente espessadas, correspondendo ao que ocorre com as sépalas nos tecidos reprodutivos. A ocorrência de câmaras de ar no interior dessas cápsulas é remanescente do que é observado em tecidos assintomáticos, onde as brácteas ficam dispostas em torno dos meristemas ou gemas axilares e apicais, protegendo-os contra dessecação e injúria mecânica (Figura 9 I-L).

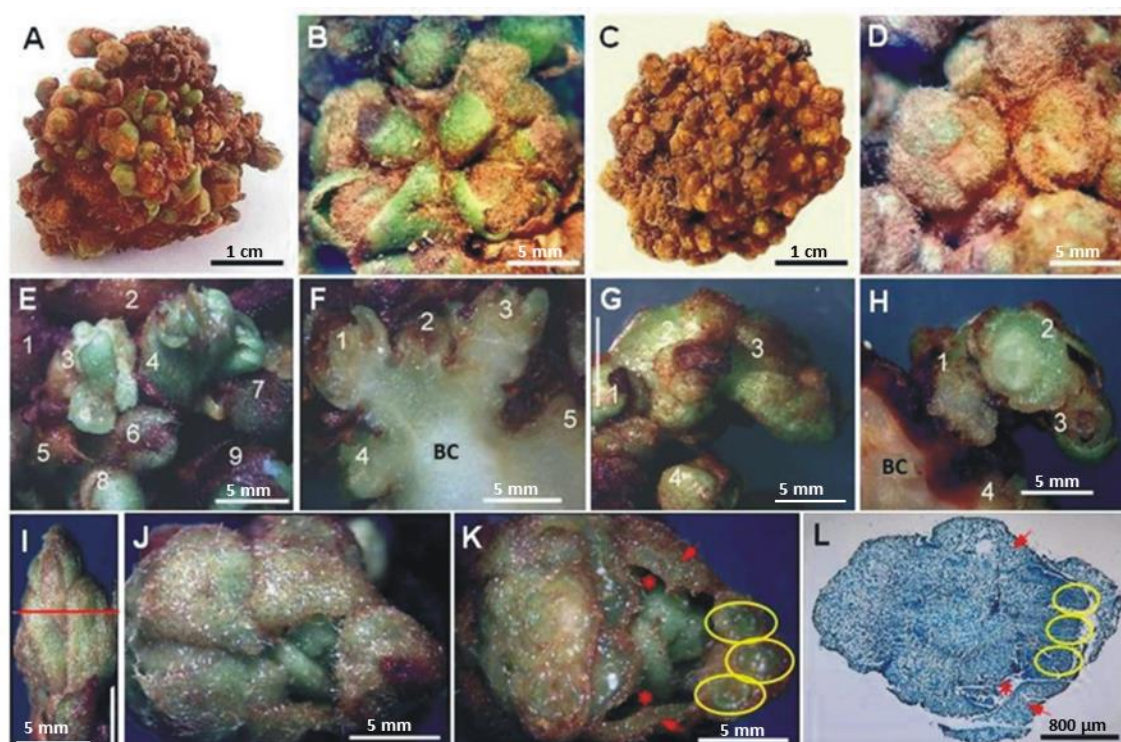


Figura 9 - Galhas no ramo principal de guaranazeiro. **A-D** - proliferação de cápsula de gemas vegetativas reunidas em um nó de ramificação. **A e B** – galhas em plantas jovens. **C e D** – galhas em plantas adultas. **E-H** – Cacho de cápsulas durante a formação inicial das galhas em planta jovem de viveiro. **E** - pelo menos nove cápsulas podem ser contadas em um único ponto de ramificação da planta. **F** - corte longitudinal da estrutura em **E**, evidenciando cerca de cinco cápsulas e um tipo de tecido conector basal (BC), que faz a conexão das cápsulas entre si e com o ramo da planta afetada, formando a galha. **G** - ramo menos afetado de planta jovem, com pelo menos quatro cápsulas justapostas consecutivamente e não lado a lado. **H** - corte longitudinal da estrutura em **G** mostrando o tecido conector basal. **I-L** - Sintomas de superbrotamento em ramos de mudas de viveiro. **I**: “cápsula” vista externamente, linha vermelha indica o plano do corte transversal apresentado em **K**. **J** - a mesma cápsula, visto de cima para mostrar a espessura da camada externa circundante e a presença de órgãos mal diferenciados e malformados **L** - corte histológico da mesma “cápsula”, corado com azul de toluidina. (*) Espaço de ar dentro da “cápsula”. As setas vermelhas indicam a camada externa das cápsulas, que provavelmente são brácteas extremamente espessas. Os círculos indicam possíveis meristemas independentes e malformados

5.4 Expressão diferencial em tecido sintomático e assintomático

RNA-Seq e dados proteômicos foram usados para identificar genes e proteínas diferencialmente expressos em tecidos sintomáticos infectados por *F. decemcellulare* e assintomáticos não infectado. O transcriptoma *de novo* foi montado a partir de um conjunto de 231 milhões de sequências brutas, depois do controle de qualidade e descarte das sequências do patógeno, removidas a partir das *reads* mapeadas no genoma do *F. decemcellulare*. Houve um intervalo de 64 – 74 % das *reads* mapeadas no transcriptoma *de novo*, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - *reads* mapeadas no transcriptoma *de novo* de tecido sintomático e assintomático de guaranazeiro

Guaranazeiro	Tecido	<i>Reads</i> sem tratamento	<i>Reads</i> com tratamento	<i>Reads</i> sem RNAr residual	<i>Reads</i> mapeadas ao transcriptome <i>de novo</i>
Planta com sintomas 1	Superbrotamento em gemas vegetativas	37050990	30967107	26519915	18790814 (70,09%)
Planta com sintomas 2	Superbrotamento de galha	34332124	29745813	24078427	17732160 (73,6%)
Planta com sintomas 3	Superbrotamento em flores	56240974	49518589	44892989	33520542 (74,7%)
Planta sem sintomas 1	Gema vegetativa	38142798	32322526	696262	445980 (64,1%)
Planta sem sintomas 2	Flor	40096576	34832000	32574694	23601419 (72,5%)
Planta sem sintomas 3	Flor	25172860	22358782	21723872	16009052 (73,7%)
Total		231036322	199744817	150486159	

Quanto à análise proteômica comparativa entre flores sintomáticas e assintomáticas em dois estádios de desenvolvimento, foi obtido um total de 32.802 peptídeos (11.199 para flores saudáveis, 10.784 para sintomático estágio 1 e 10.819 para sintomático estágio 2). Em relação ao número de proteínas identificadas em cada condição, 803 foram encontradas em flores

assintomáticas, 1152 e 926 em flores sintomáticas estágio 1 e 2 respectivamente. Entre as proteínas com expressão diferencial, 222 ocorreram em flores assintomáticas, 447 em flores doentes no estágio 1 e 277 no estágio 2.

Ensaio de RNAseq foram realizados para comparar bibliotecas de cDNA preparadas com tecidos vegetativos e reprodutivos de ambas as condições. A análise resultou um total de 4529 genes diferencialmente expressos, representando termos GO como processo celular, processo metabólico, regulação biológica, ligação, atividade catalítica, célula, organela (Fig. 10, 11 e 12). Entre os genes expressos diferencialmente, destacamos os genes envolvidos no processo metabólico de hormônios vegetais (Apêndice A). Os genes diferencialmente expressos em tecido sintomático compreendem sinalização de resposta de auxina (RBX1, UBA1, SKP2A e RBX1), bem como genes associados ao ciclo, divisão e proliferação celular, incluindo os genes que codificam os fatores de transcrição (AtE2F2 e DPB) e genes PCBA2 (*proliferating cell nuclear antigen 2*), homólogo C da proteína 48 de controle da divisão celular (AtCDC48C), CYCB1; 1 e Wee1 (Figura 13).

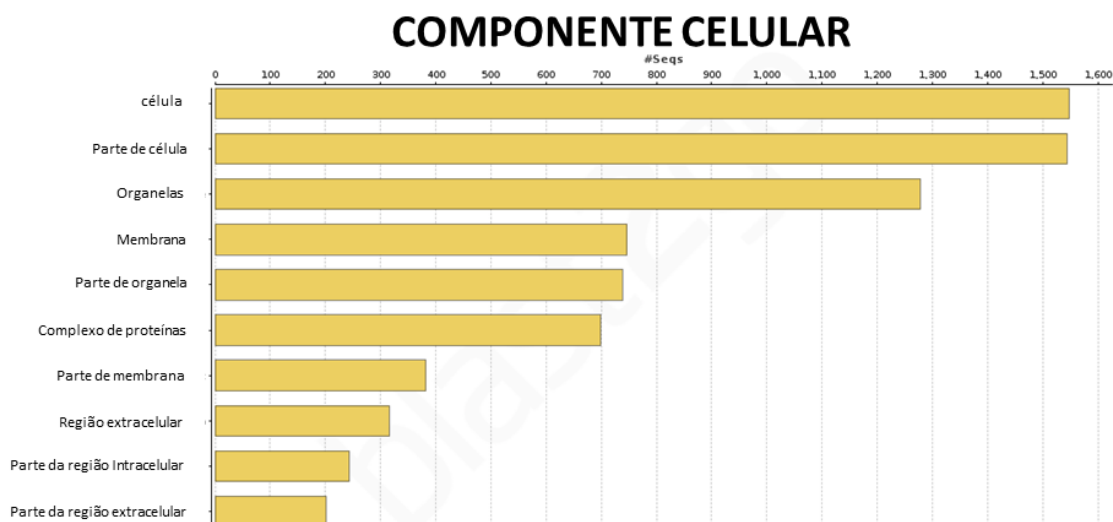


Figura 10 - Termos GO dos (top 50) associados a anotação funcional para os genes diferencialmente expressos em tecidos doentes de guaranazeiro (Componente celular)

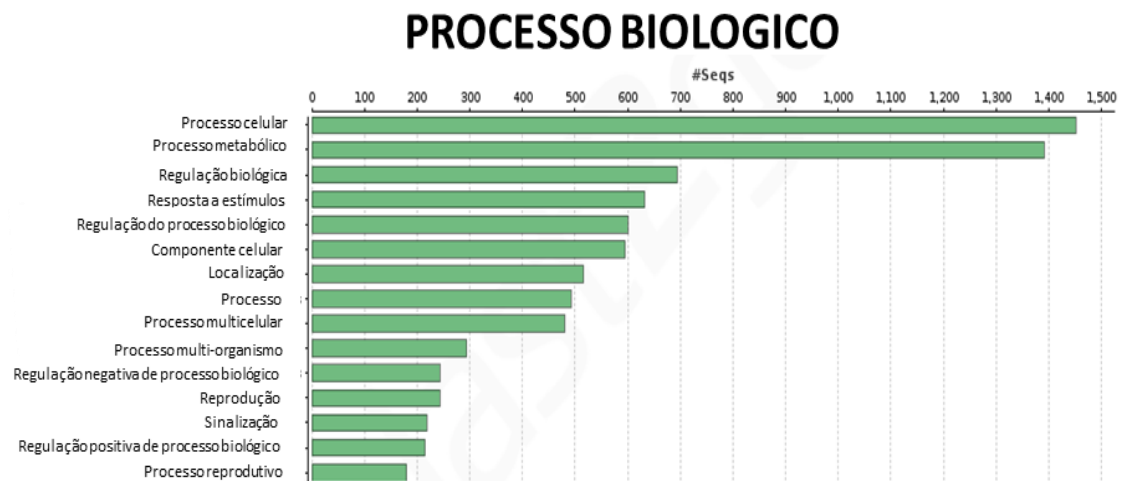


Figura 11 - Termos GO dos (top 50) associados a anotação funcional para os genes diferencialmente expressos em tecidos doentes de guaranazeiro (Processo biológico)

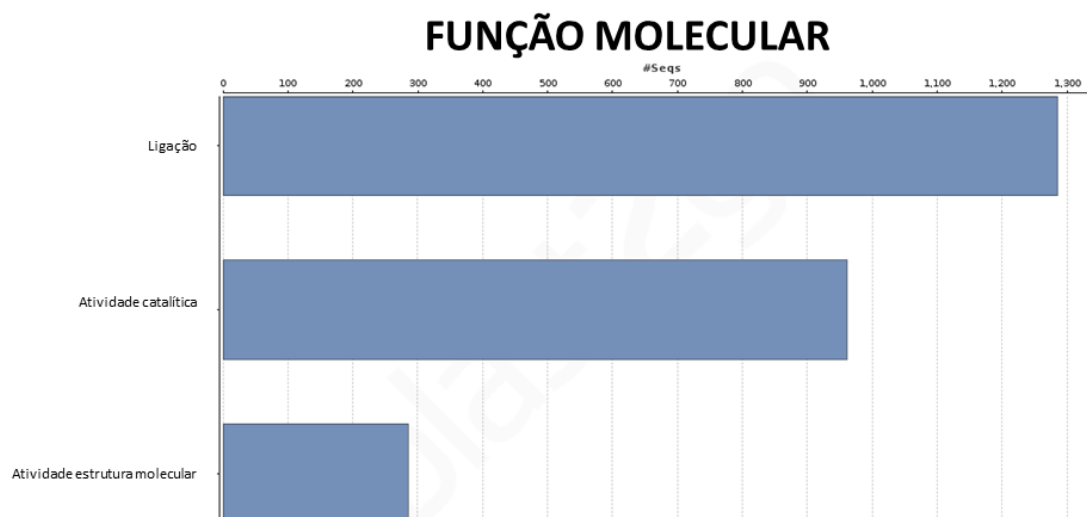


Figura 12 - Termos GO dos (top 50) associados a anotação funcional para os genes diferencialmente expressos em tecidos doentes de guaranazeiro (Função molecular)

Transcritos relacionados a genes que codificam homólogos aos Fatores de Resposta a Auxina (ARFs) AT1G19220.1 (ARF19), AT5G20730.1 (ARF7/NPH4) e transcritos para GH3.3 homólogos ao gene AT2G23170.1 de *Arabidopsis thaliana* estavam presentes exclusivamente em tecidos sintomáticos (Apêndice A) No entanto, os transcritos de PIN3 homólogos a AT1G76520

estiveram presentes exclusivamente em tecidos assintomáticos e nenhuma sequência homóloga a elementos Aux/IAA foi encontrada entre os transcritos diferencialmente expressos.

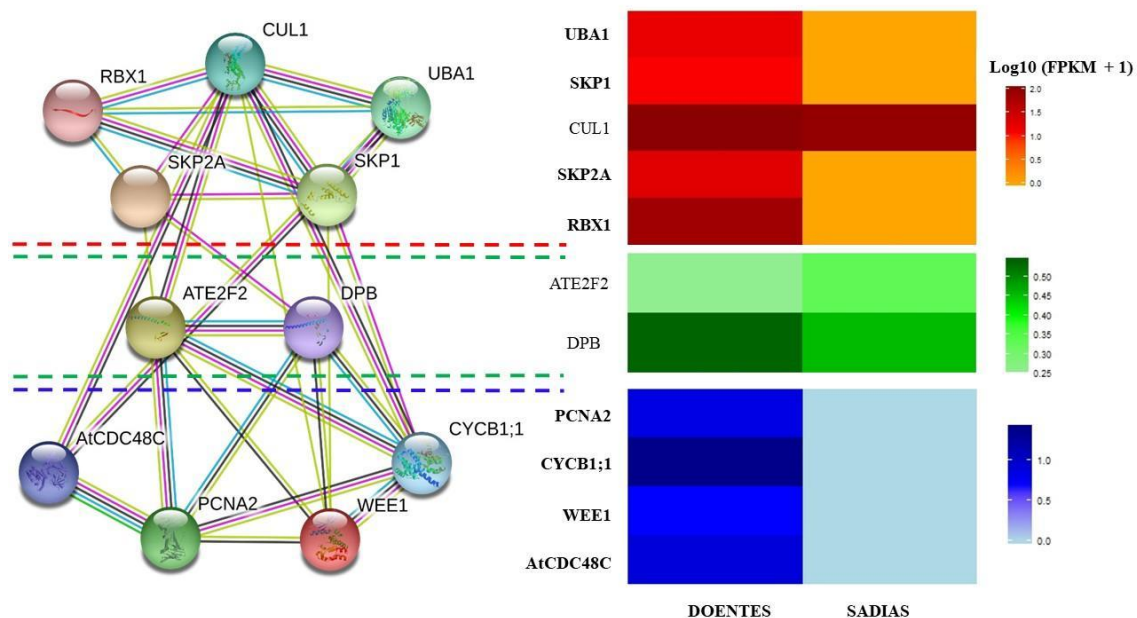


Figura 13 - Genes diferencialmente expressos no tecido com sintomas de superbrotamento. Esquerda: STRING rede de componentes do complexo SCF (Skp1-Cul1Fbox) e alguns genes a jusante. Direito: Expressão diferencial (fold-change ≥ 2 e FDR $\leq 0,05$) de componentes do complexo SCF e alguns genes a jusante. Letras em negrito indicam genes diferencialmente expressos

Genes relacionados a outros hormônios vegetais, incluindo citocinina, ácido abscísico, giberelina, etileno, ácido salicílico e jasmônico, foram diferencialmente expressos em plantas de guaraná com superbrotamento (Apêndice A). A citocinina oxidase 3 (CKX3) e a citocinina oxidase/desidrogenase 1 (CKX1) foram expressas apenas em plantas doentes. Por outro lado, MYB21, um fator de transcrição dependente da giberelina envolvido no alongamento do filamento do estame, foi expresso apenas em plantas saudáveis. A quitinase básica (hchib) relacionada à sinalização de etileno e ácido jasmônico na resistência sistêmica adquirida foi expressa exclusivamente em tecido sintomático. Genes relacionados ao ácido abscísico (ABA) foram diferencialmente expressos em plantas doentes (Apêndice A), como

ASR1 (ABA, estresse), ABF3 (estresse salino e seca), NCED3 (gene da enzima limitadora de taxa na via de síntese *de novo* de ABA), LTI65 (CAP160) (gene induzido pela privação de água, frio e estresse salino). O gene NRB4, um mediador da transcrição da RNA polimerase II, necessário para a resposta ao ácido salicílico, foi expresso apenas em plantas assintomáticas. VTC5, um gene que codifica a fosforilase de GDP-L-galactose, uma enzima comprometida com a biossíntese de ascorbato que responde ao ácido jasmônico.

Dados preliminares da análise proteômica confirmaram os resultados do transcriptoma, apoiando a ocorrência de desequilíbrio hormonal no tecido infectado. Destacamos o mecanismo de sinalização do gene da auxina pela degradação da ubiquitina (SCF TIR1 proteína, SKP2A, UBA1) e ciclo celular (PCNA e CDC48) que foram expressos exclusivamente no proteoma de tecido sintomático. Na figura 14 são mostrados o perfil de proteínas em SDS-PAGE e a seleção de faixas do gel que foram excisadas para identificação por MS/MS.

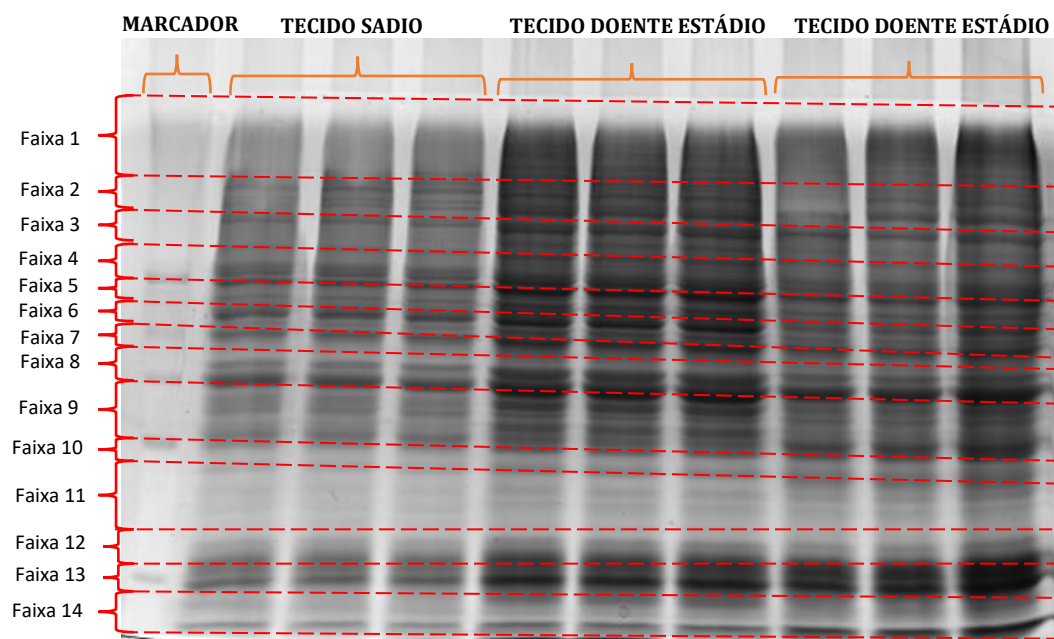


Figura 14 - Gel SDS-PAGE corados com Comassie *blue* R-350 mostrando seleção de proteínas das três condições: flor sadia, flor doente estágio 1 e flor doente estágio 2. As faixas (1-14) selecionadas para recorte são indicadas à esquerda pelas linhas pontilhadas. As amostras de cada condição foram aplicadas no gel em triplicadas. Foram utilizados 15 µg de extrato protéico em cada poço.

5.5 Detecção de IAA secretado por *Fusarium decemcellulare*

Para obter informações sobre infecção causada por *F. decemcellulare* que pode ajudar a um melhor entendimento dos processos moleculares relacionados às interações patógeno-hospedeiro, o genoma completo do patógeno e o transcriptoma foram obtidos. Genes relacionados à biossíntese de auxina foram identificados no genoma e no transcriptoma em condições *in vitro* (dados não mostrados). Para confirmar que *F. decemcellulare* é capaz de produzir IAA, foi feita a análise UPLC-QTOF-MS^E além dos dados da análise de espectrometria de massa de alta resolução. Padrão analítico (IAA de origem vegetal) foi utilizado para confirmação inequívoca da presença de IAA em condições *in vitro*.

O cromatograma do modo de íons negativos em Varredura Completa (m/z 120 - 1180 Da) e cromatogramas de íons extraídos (m/z 174,05 Da), referente ao padrão analítico de IAA e a amostra de *F. decemcellulare* (Figura 19). O padrão analítico mostrou um tempo de retenção de 5min e 30s e íon precursor m/z 174,0561 $[M-H]^-$ consistente com a fórmula molecular de IAA $C_{10}H_9NO_2$ com erro inferior a 5 ppm. A fragmentação do íon precursor de m/z 174.0549 sugeriu a perda neutra de CO_2 (- 44 Da) e formação de um produto iônico de m/z 130.0662 (Figura 19).

A amostra de *F. decemcellulare* (CML 3423) mostrou o mesmo tempo de retenção que o padrão analítico de 5min e 30s (Figura 19) e a mesma fórmula molecular $C_{10}H_9NO_2$ com erro inferior a 5 ppm. A fórmula molecular e fragmentação do mecanismo são bases de semelhança inequívocas para identificação de IAA.

Os fragmentos de íons encontrados em *F. decemcellulare* amostra são consistentes com o mecanismo de fragmentação do padrão analítico (Figura 15 e 16) e dados da literatura (Chiwocha et al. 2003; Matsuda et al. 2005). Observa-se que a partir do íon precursor m/z 174,0546, há formação de um íon produto em m/z 130,0657 $[MH-CO_2]^-$. Dados cromatográficos e espectroscópicos do padrão analítico em comparação com amostras de dois

isolados confirmam que *F. decemcellulare* é capaz de produzir IAA no meio MS triptofano.

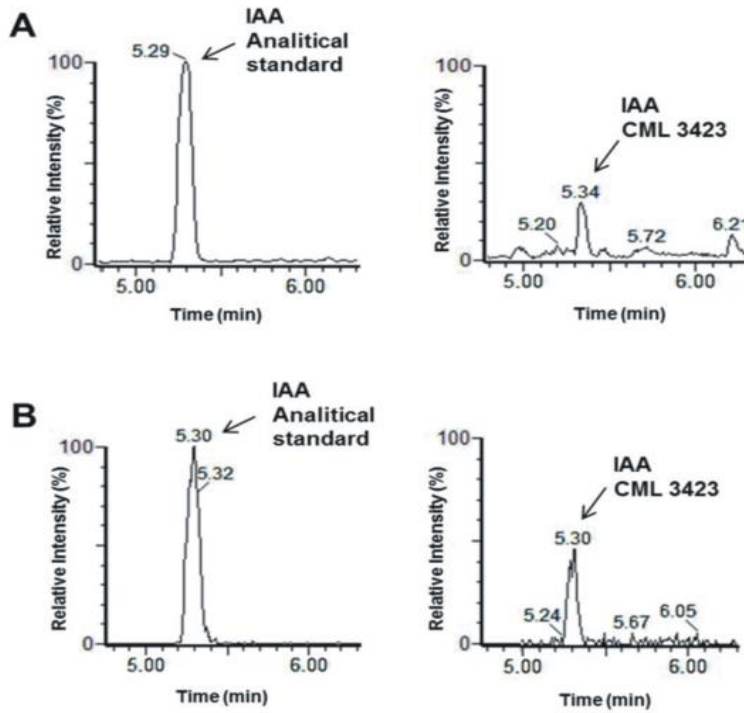


Figura 15 - Detecção de ácido indol-3-acético (IAA) por UPLC-QTOF-MSE. **A** - Cromatograma em modo de íon negativo Full Scan (m/z 120–1180 Da). **B** - íon extraído (m/z 174,05). Os tempos de retenção do composto são: **(A)** 5,29 min para o padrão analítico (IAA de origem vegetal) e 5min e 34s para *Fusarium decemcellulare* (CML 3423). **(B)** 5min e 30s para o padrão analítico e *F. decemcellulare* (CML 3423)

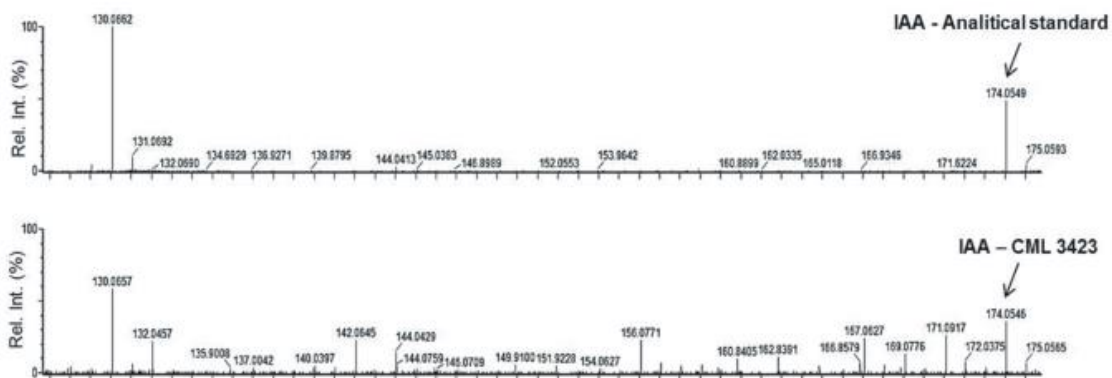


Figura 16 - Dados de espectro de massa para a molécula do precursor do ácido indol-3-acético (IAA) (m/z 174,05) e produto (m/z 130) para o padrão analítico, de origem vegetal, e *Fusarium decemcellulare* CML 3423 analisados íons

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, sintomas de superbrotamento em três diferentes tipos de órgãos do guaranazeiro foram dissecados, analisados e comparados a órgãos e tecidos assintomáticos. As características semelhantes nas estruturas observadas foram a redução do eixo longitudinal de todos os órgãos que puderam ser identificados (entrenós e flores, por exemplo) e a ocorrência de estruturas morfológicas com sintomas característicos da doença, aqui denominadas pela primeira vez de cápsulas (Figuras. 10 E, 10 A, 12 F, 13 I, J e K). Essas cápsulas que acumulam internamente órgãos e tecidos com malformações celulares e histológicas. As cápsulas apresentaram invariavelmente envoltórios externos extremamente espessos.

Estruturas vegetativas das flores (sépalas e pétalas) e brácteas nos órgãos vegetativos têm aspecto foliáceo (tipo folha) nos órgãos assintomáticos e aparência de casca, constituindo as camadas externas das “cápsulas”, em tecidos sintomáticos. Sugerimos que o espessamento desses tecidos se deve ao mesmo fator que leva à redução do eixo longitudinal das flores, peças reprodutivas florais e células florais, bem como ao encurtamento dos internódios. As espessas camadas externas das cápsulas nas inflorescências também impedem a antese e a exposição de peças reprodutivas (Figura 10 A, B, C vs C, D, F).

Os primeiros sintomas da doença consistem em multiplicação de ramificações a partir de um único ponto ou nó, onde deveria haver a produção de apenas um ramo secundário. Nessa fase da doença, ainda há alongamento e diferenciação das folhas nesses ramos supranumerários. Esse fenômeno às vezes também pode ser observado na porção apical do ramo de plantas adultas sintomáticas, que já apresentam internódios subapicais encurtados, mas ainda podem gerar ramos jovens alongados na maioria dos nódulos apicais, o que denota um caráter de manifestação local dos sintomas. Após a eclosão dos ramos, ocorre uma redução do comprimento do entrenó do caule principal e formação de cápsulas nos nós ou pontos de ramificação, impedindo o alongamento normal e a diferenciação dos meristemas capturados em seu interior (Figura 12 K). Nos estádios tardios da doença, a completa ausência de

alongamento e diferenciação normal de ramos secundários e raquis de inflorescências, somada à proliferação contínua provoca o acúmulo de cápsulas sobre um dos nós do ramo principal do guaranazeiro, produzindo o sintoma conhecido como galha. Mesmo nesta fase avançada da doença, os tecidos internos das cápsulas, apesar de malformados, não apresentaram amolecimento, apodrecimento ou escurecimento, mau odor ou exsudação de líquidos putrefatos.

Neste estudo, os dados transcriptômicos e preliminares de proteoma da interação apoiam a ocorrência de desequilíbrio hormonal na proliferação excessiva causada por *F. decemcellulare*. A evidência de que esse patógeno produz IAA, aqui relatada pela primeira vez, indica uma das possíveis causas das alterações nos níveis hormonais. Resultados semelhantes foram relatados em várias malformações e galhas de plantas causadas por bactérias, fungos, protistas e insetos (Teixeira et al. 2014; Bailey et al. 2015; Liu et al. 2016; Liu et al. 2017; Lan et al. 2019).

No guaranazeiro, os brotos supranumerários originados de um mesmo nó são uma alteração facilmente associada a níveis alterados de atividade de auxina. Isso pode ser interpretado como uma perda ou diminuição da dominância apical. A redução do eixo longitudinal das flores e órgãos florais, como filamentos e estiletos de anteras, e o comprimento reduzido dos internódios do caule principal e das ráquias da inflorescência, também podem estar relacionados ao desequilíbrio dos níveis hormonais. São função primária dos reguladores de crescimento da classe das auxinas durante o desenvolvimento dos órgãos vegetativos e reprodutivos a dominância apical e alongamento da planta, começando pela diferenciação do meristema (Takase et al. 2004; Perrot-Rechenmann 2010). Genes e proteínas diferencialmente expressos relacionados ao mecanismo de sinalização de auxina, bem como genes responsivos a auxina associados ao ciclo, divisão e proliferação celular ocorreram em tecidos infectados (Figura 17), esses dados combinados com a expressão diferencial do gene GH3 no tecido infectado e a identificação do GH3 expresso exclusivamente no tecido de guaranazeiro sintomática podem ser indicativos da ação da auxina nos sintomas de superbrotamento causado por *F. decemcellulare*.

O excesso de auxina é necessário para acionar a expressão de genes GH3, como parte da reação da planta para manter as concentrações fisiológicas nativas de auxina. GH3.8 é relatado como responsivo ao IAA em arroz (Li et al. 2016) e soja (Gee et al. 1991). Li et al. (2016) relatou que a função do GH3 está relacionada à repressão da atividade da auxina e ao aumento da produção de ácido salicílico, que inicia uma resposta sistêmica adquirida (SAR). A expressão de GH3 foi demonstrada em diferentes hospedeiros durante a interação com patógenos produtores de auxina, como *Agrobacterium tumefaciens* (Lee et al. 2009) e *Monilophthora perniciosa* Stahel (Teixeira et al. 2014).

Altas concentrações de auxina também podem interferir no metabolismo da citocinina mediado pela citocinina oxidase (Palni et al. 1988). Dados transcriptômicos de tecido sintomático de guaranazeiro revelaram que a citocinina oxidase 3 (CKX3) e a citocinina oxidase/desidrogenase 1 (CKX1) foram expressas exclusivamente em tecido de plantas doentes.

Como esperado, a maioria dos genes relacionados ao ABA foram diferencialmente expressos em plantas doentes. *Asr1* (amadurecimento por estresse com ácido abscísico) é um gene presente em várias espécies de plantas, com papel comprovado na tolerância ao estresse (Dominguez e Carrari 2015), cujos níveis são aumentados pelo sal, estresse hídrico e exposição ao ABA. *Asr1* tem um papel duplo como proteína chaperona para termotolerância e fator de transcrição envolvido na *cross-talking* do hormônio açúcar (Carrari et al. 2004). O gene *NRB4* é necessário para a resposta ao SA e foi encontrado exclusivamente em plantas assintomáticas. Plantas de *Arabidopsis thaliana* com alelos nulos de *NRB4* são insensíveis a SA e são estéreis, com crescimento prejudicado (Canet et al. 2012). Este resultado indica que a ausência /redução da expressão do gene *nrb4* em plantas de guaraná pode ter um papel no crescimento e desenvolvimento anormais de verticilos florais em plantas infectadas.

A sinalização do ácido jasmônico está envolvida na regulação da síntese antioxidante, tendo impacto na biossíntese do ascorbato. Curiosamente, o *vtc5*, gene que codifica a fosforilase da biossíntese do ascorbato para a GDP-

L-galactose, foi expresso apenas em plantas sintomáticas, indicando uma possível resposta da planta à infecção do patógeno, a fim de manter a homeostase antioxidante.

Outro gene que foi expresso de forma altamente diferencial em plantas doentes foi o gene *hchib*, que codifica uma quitinase básica envolvida na via de sinalização mediada por etileno / ácido jasmônico durante a resistência sistêmica adquirida. Jasmonato está implicado na inibição do crescimento e ativação da defesa da planta (Koo e Howe 2009), nossos resultados corroboram com esse papel do jasmonato, uma vez que os tecidos doentes tinham alta expressão de NINJA (suposto *interactor of JAZ*), um repressor da resposta ao jasmonato. Acosta et al. (2013) relataram que NINJA é indispensável para reprimir a sinalização de JA e manter o crescimento normal da raiz. A falta de expressão de NINJA e de função interativa também podem corroborar para as anormalidades de crescimento observadas, com respostas de defesa induzidas concomitantes em plantas de guaraná infectadas.

Em relação aos genes relacionados à auxina, PINs, que não foram regulados positivamente em tecidos sintomáticos, apesar da superexpressão de ARFs, incluindo ARF7 que tem sido diretamente relacionado a ativação da PIN3 (Chen et al. 2015), que são transportadores ou exportadores de efluxo de auxina, são constantemente reciclados nos endossomos e realocados nas membranas para ajustar os efeitos da auxina. Uma interrupção na distribuição de proteínas transportadoras ao longo das membranas plasmáticas celulares, onde estão imersas, foi relatada como consequência da exposição a altos conteúdos de auxina interna, levando a divisões celulares interrompidas e anormais (Petrásek et al. 2002; Rakusová et al. 2016).

A distribuição adequada de proteínas PIN nas membranas plasmáticas, referida como polarização, é determinada pelo fluxo de IAA endógeno a partir de sua célula produtora às células receptoras (Bennett et al. 2016). Sabe-se que os embriões não tiveram essa polarização por um tempo e os transportadores de PIN são globalmente distribuídos ao redor das células. Supondo que as células meristemáticas sejam similarmente baixas ou menos polarizadas do que as células totalmente diferenciadas, a liberação de IAA

produzida pelo *F. decemcellulare* no interior do guaranazeiro colonizado, os meristemas podem estar relacionados à diferenciação, organização e filotaxia dos tecidos.

Muitas proteínas Aux/IAA, por sua vez, são negativamente reguladas quando ARF3/ETT é altamente expresso seguindo um modelo alternativo e relativamente independente de IAA de controle de genes de resposta de auxina (Simonini et al. 2017). A busca por genes diferencialmente expressos mediante a infecção de plantas de guaraná por *F. decemcellulare* e a validação do padrão de expressão em diferentes órgãos não foi finalizado ainda, e nosso grupo continua investigando para descobrir por que os repressores Aux/IAA não foram capturados entre aqueles regulados positivamente.

Níveis reduzidos de IAA impedem o alongamento normal e a diferenciação de células vegetais em meristemas vegetativos sintomáticos ou flores em diferenciação. A inibição do alongamento e aquisição da forma e tamanho normais podem prejudicar a exposição das células aos gradientes espaciais normais dos reguladores de crescimento e determinantes da identidade das células do meristema, contribuindo para a diferenciação anormal ou falta de diferenciação das células encurtadas sintomáticas com paredes espessas, que permanecem em linhas espacialmente desorganizadas fazendo com que haja o acúmulo de estruturas mal formadas dentro cápsulas. Esta desorganização local dos tecidos e meristemas diferenciadores evolui para a filotaxia anormal ou distribuição de órgãos vegetativos e florais mal formados ao longo do eixo da planta, o que pode ser considerado como uma consequência da perturbação contínua na dominância apical e outros mecanismos relacionados ao transporte de auxina como o alongamento celular e / ou da disseminação simultânea da colonização do patógeno e distúrbios de auxina ao longo do hospedeiro. O extremo dessa condição pode ser o acúmulo de cápsulas no mesmo ponto de ramificação, formando o que se denomina galhas. Nesse extremo, aparentemente, nem mesmo a indução do florescimento é possível, e apenas estruturas vegetativas malformadas são encontradas no cápsulas.

O tempo entre a observação das cápsulas em inflorescências ou ramos secundários à observação de galhas em plantas de guaraná também

sugere que a infecção do tecido meristemático é gradual e localizada. A poda de ramos sintomáticos é utilizada como forma de controle da doença e corrobora essa hipótese, uma vez que novos ramos saudáveis podem ser produzidos após a eliminação dos enfermos (Araújo et al. 2006). A(s) forma(s) exata(s) de infecção e subsequente colonização pelo patógeno ainda não são conhecidas. Em outras espécies de *Fusarium*, tal como *F. oxysporum* (Schltdl) e *F. solani* (Mart.) Sacc. causando murcha de fusarium e podridão do caule, respectivamente, a infecção em tecidos de maracujá (*Passiflora edulis* Sims), ocorrendo inicialmente pela penetração da epiderme, colonização dos vasos do xilema por hifas e microconídios com crescimento inter e intracelular, formando hipertrofia e hiperplasia do câmbio, xilema e floema (Ortiz et al.2014). A investigação microscópica detalhada da infecção de *F. graminearum* Schwabe em espigas de trigo revelou que, após a infecção, o patógeno cresceu nos espaços intercelulares, as hifas se tornaram abundantes e as células hospedeiras perderam todo o seu conteúdo celular pouco antes da colonização intracelular (Brown et al.2010).

No futuro, esperamos contribuir com novos estudos, que expliquem como ocorre a infecção e interação de *F. decemcellulare* e plantas de guaraná, com o objetivo de orientar programas de controle de reprodução e de germinação. Além do estudo em plantas de guaraná, nossos resultados podem ajudar a entender o patógeno e a relação com outras plantas hospedeiras, que apresentam sintomas semelhantes, e seus possíveis efeitos que afetam o desenvolvimento dessas plantas.

CAPÍTULO II

Identificação de proteínas diferencialmente abundantes entre tecidos florais assintomático e com sintomas de superbrotamento causado por *Fusarium decemcellulare* em guaranazeiro (*Paullinia cupana* var *sorbilis*)

8. MATERIAL E MÉTODOS

8.1 Material vegetal

As amostras foram obtidas em condições de campo de três diferentes genótipos clonais de guaranazeiro (plantas oriundas de propagação por estaquia) aqui denominados de clone 375, 613 e 626, e de cada clone foram feitas três repetições técnicas totalizando as 18 amostras de extrato proteico.

Os clones 375, 613 e 626, todos tolerantes ao superbrotamento, e mantidos no banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental, Estrada AM-010 Km 29, Manaus-AM. De cada clone de guaranazeiro foram coletados flores sadias e flores doentes com sintomas de superbrotamento (Figura 17), essas inflorescências foram divididas em três quadrantes de modo a se obter uma triplicata biológica de cada clone, de cada quadrante foi coletado tecido floral para isolamento de *F. decemcellulare* e confirmação da infecção pelo patógeno, para extração de RNA e extração de proteínas (Figura 18). Todos os tecidos foram submetidos ao protocolo de isolamento conforme descrito por Batista e Bolkan (1982). Foram admitidos como tecidos assintomáticos (sadios) aqueles que além de não apresentarem sintomas da doença também não foram detectados o patógeno *F. decemcellulare*.

Os tecidos de guaranazeiro sintomáticos foram todos confirmados por meio do isolado *F. decemcellulare*, este foi denominado tecido doente (Figura 19). Para extração de proteínas e RNA, as amostras foram coletadas e armazenadas em tubos *falcons* contendo nitrogênio líquido e imediatamente acondicionados em caixa com gelo seco e preservados a -80°C até o momento da extração.



Figura 17 – Flores de guaranazeiro. A – Flor sadia assintomática. B – Flor doente com sintomas de superbrotamento

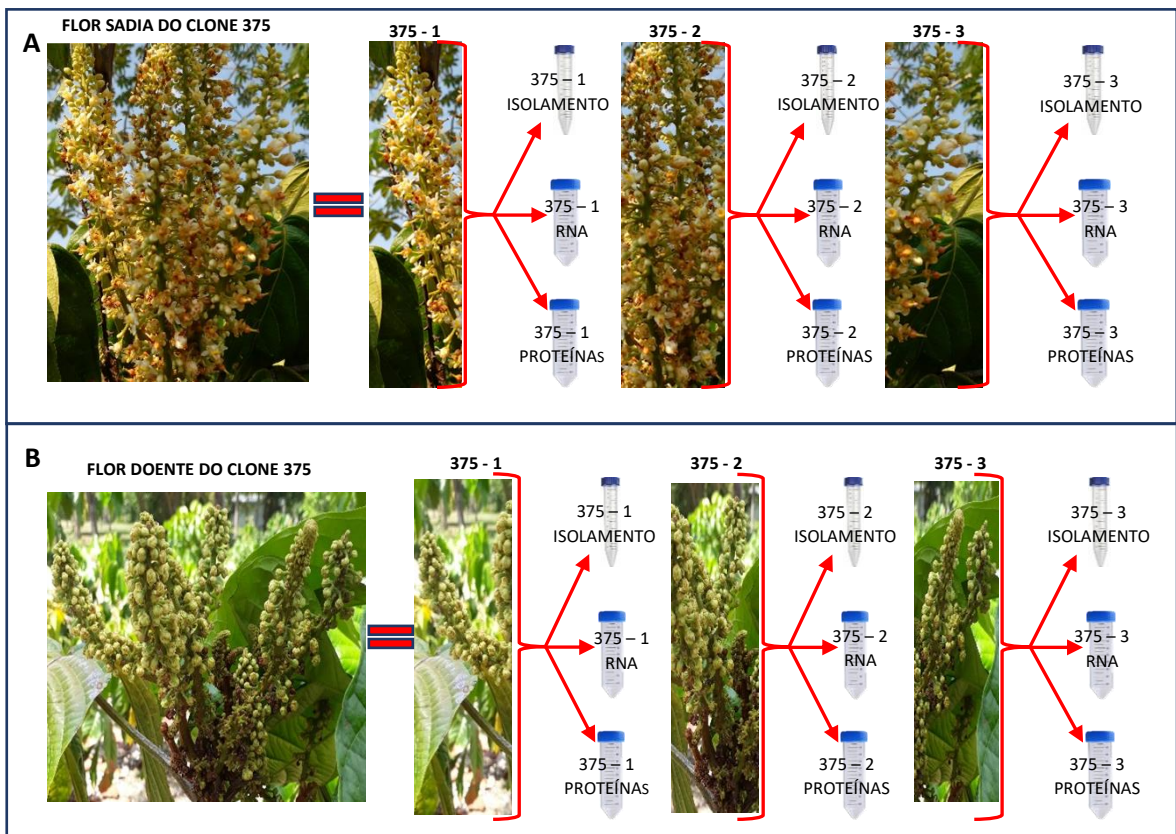


Figura 18 – Flores de guaranazeiro do clone 375. Esquema representando a coleta do material vegetal das flores doentes e flores saudáveis

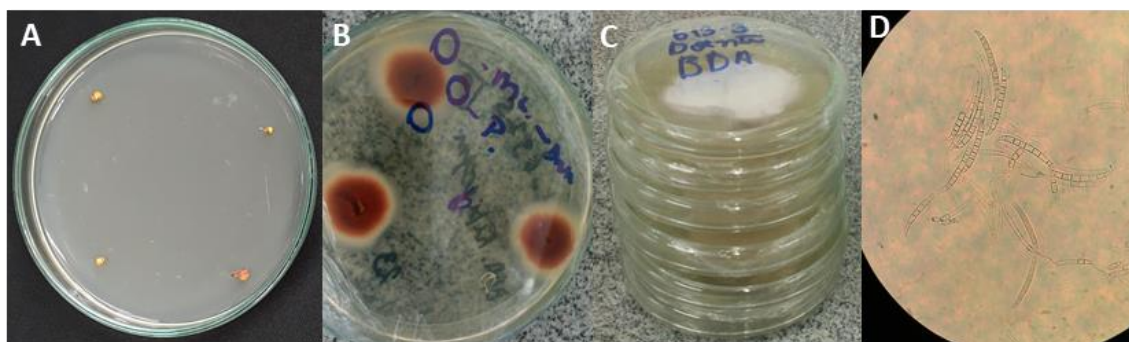


Figura 19 – Isolamento de *F. decemcellulare*. **A** – fragmentos de flores de guaranazeiro após assepsia para isolamento. **B** – culturas crescidas em meio ágar-água após 3 dias, marcação para retirada de fragmentos para o repique em meio BDA. **C** – culturas com morfologia de *F. decemcellulare* crescidas em meio BDA para esporulação. **D** – visualização através do microscópio de macroconídios de *F. decemcellulare*, confirmando a presença do fungo no tecido doente

8.2 Obtenção do extrato protéico

A extração de proteínas totais foi realizada após confirmação da presença ou ausência de *F. decemcellulare* nos tecidos florais sintomático e assintomático respectivamente.

Inicialmente 2g do tecido foram macerados na presença de nitrogênio líquido e PVPP (0,05 g), utilizando almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. O protocolo utilizado foi o mesmo para as duas condições: SDS-Fenol (SOUZA et al., 2014), descrito no anexo I.

8.3 Quantificação das proteínas

A quantificação de proteínas totais foi realizada ressuspendendo o *pellet* em 500 μ L do tampão contendo uréia 8 M. Após, 1 μ L desta amostra foi misturado aos reagentes fluorométrico do kit comercial de ensaio de proteína Qubit™ (Invitrogen™), preparado de acordo com a instrução do fabricante e incubados por 5 min e lidos no equipamento Fluorômetro Qubit® modelo 3.0. Esse método consiste na ligação seletiva dos corantes do ensaio Qubit à proteína, quantificando de maneira rápida e específica tornando-o mais sensível que a absorvância UV.

8.4 SDS-PAGE

Análise SDS-PAGE dos extratos obtidos, foi realizada com uma alíquota solubilizada em 200 μ L de tampão desnaturante contendo Tris-HCl 0,2 M pH 6,8; 4% (v/v) SDS; 4% (v/v) β -mercaptoetanol; 20% (v/v) glicerol; 0,1 % (p/v) azul de bromofenol. Após dosagem, 25 μ g de proteínas totais foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12 %, utilizando tampão Tris-Glicina 1x pH 8,3 (Tris 0,025 M; Glicina 0,192 M, SDS 0,1%), sob uma tensão de 250V e corrente constante de 50 mA por gel no sistema Hoefer SE 600 Ruby (Amersham Bioscience). Para a visualização, o gel foi incubado na solução de coloração com Azul de Comassie Coloidal (8% sulfato de amônio, 0,8% ácido fosfórico, 0,08 % Comassie Blue G-250, 20% metanol) por duas horas, e descorado com água deionizada *overnight*.

Para as amostras a serem analisadas por espectrometria de massas, a análise por eletroforese em gel de poliacrilamida ocorreu parcialmente, e as bandas foram excisadas com uso de bisturi previamente esterilizado.

8.5 Digestão das amostras

A digestão das amostras do extrato protéico consistiu em redução (10 mM de ditioneitol por 30 min a 56°C), alquilação (14 mM de iodoacetamida por 30 min em temperatura ambiente mantido no escuro), 20 ng/μL de tripsina (Promega) seguido de incubação durante 16 h a 37°C. Para interromper a reação da enzima foi adicionado TFA (ácido trifluoroacético) na concentração final de 0,4% até o pH das amostras ficarem abaixo de 2.0. Em seguida, foi aliquoteado 0.4% de ácido fórmico. Após digestão, as amostras foram liofilizadas, e armazenadas a -20 °C até a realização das análises.

8.6 Espectrometria de massas

Os experimentos de espectrometria de massas foram realizados pela plataforma Proteomics do CHU de Quebec Research Centre, Quebec, Canadá.

As amostras foram analisadas por nano LC / MSMS usando sistema de cromatografia Dionex UltiMate 3000 nanoRSLC (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA) conectado a um espectrômetro de massa Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA). Os peptídeos foram presos a 20μL/min em solvente de carga (2% de acetonitrila, 0,05% de TFA) em uma pré-coluna de cartucho de pepmap C18 de 5 mm x 300 μm (Thermo Fisher Scientific / Dionex Softron GmbH, Germering, Alemanha) durante 5 min. Em seguida, a pré-coluna foi trocada online com uma coluna Pepmap Acclaim (ThermoFisher) 50 cm x 75 μm de diâmetro interno coluna de separação e os peptídeos foram eluídos com um gradiente linear de 5-40% de solvente B (A: 0,1 % de ácido fórmico , B: 80 % de acetonitrila, 0,1% de ácido fórmico) em 200 min, a 300 nL/min. Os espectros de massa foram adquiridos usando um modo de

aquisição dependente de dados usando o *software* Thermo XCalibur versão 4.3.73.11. Os espectros de massa de varredura completa (350 a 1800 m/z) foram adquiridos na órbita usando um alvo AGC de 4 e 5, um tempo máximo de injeção de 50 ms e uma resolução de 120.000. Calibração interna usando massa de bloqueio no íon siloxano m/z 445.12003 foi usado. Cada varredura de MS foi seguida por fragmentação de MS/MS dos íons mais intensos por um tempo de ciclo total de 3 s (modo de velocidade máxima). Os íons selecionados foram isolados usando o analisador quadrupolo em uma janela de 1,6 m/z e fragmentados por dissociação induzida por colisão de alta energia (HCD) com 35 % da energia de colisão. Os fragmentos resultantes foram detectados pela armadilha iônica linear em taxa de varredura rápida com um alvo AGC de 1 e 4 em um tempo máximo de injeção de 50 ms. A exclusão dinâmica de peptídeos previamente fragmentados foi estabelecida por um período de 20 s e uma tolerância de 10 ppm.

8.7 Pesquisa de banco de dados

Os arquivos da lista de picos MGF foram criados usando o *software* Proteome Discover 2.3 (Thermo). Os arquivos de amostra MGF foram então analisados usando o Mascot (Matrix Science, London, UK; versão 2.5.1) e comparados com os bancos de dados do genoma e transcriptoma do *F. decemcellulare*, transcriptoma da interação (*F. decemcellulare* e guaranazeiro) e transcriptoma do guaraná disponível em (<http://www.lmb.cnptia.embrapa.br/tools/Fusariumdecemcellulare/>). Para as buscas, o Mascot foi programado com uma tolerância de massa de fragmento de íon de 0,60 Da e uma tolerância de íon parental de 10,0 PPM. Carbamidometilação de cisteína foi especificado no *software* como uma modificação fixa, enquanto a desamidação de asparagina e glutamina e oxidação de metionina foram especificadas como modificações variáveis, permissão de até duas clivagens de tripsina perdidas foram permitidos.

8.8 Identificação de proteínas

A identificação e quantificação (label-free) das proteínas foram feitas através da análise de dados MS/MS brutos pelo software MaxQuant v 1.5.2.8 usando a base de dados Andromeda. Foram utilizados níveis de tolerância de 4,5 ppm para MS e 20 ppm para MS/MS. Reporter ion MS2: 10plex TMT foi incluído nos parâmetros de pesquisa e a especificidade da enzima foi definida para tripsina com no máximo duas clivagens perdidas. A normalização foi realizada dividindo a intensidade do íon repórter de cada peptídeo alvo pela soma das respectivas intensidades do íon relatado dos dois peptídeos ACTB. As análises de proteínas diferencialmente abundantes foram conduzidas usando o pacote DEP v.1.12 (Zhang et al 2018) do R, adotando o desenho experimental que consistiu de triplicatas biológicas (613, 626 e 375) nas condições superbrotamento e sadio. As análises foram conduzidas utilizando os valores médios de intensidade obtidos das três repetições de cada uma das triplicatas biológicas de cada condição. Na sequência, o conjunto de dados foi submetido à filtragem e os peptídeos identificados em somente uma das triplicatas biológicas de cada condição foram removidos das análises subsequentes. Uma transformação logarítmica (\log_2) foi utilizada como estabilizadora da variância enquanto a imputação de dados perdidos foi feita por meio de sorteio aleatório da distribuição normal usando o método '*MinProb*'. A análise de agrupamento das proteínas do tecido doente e tecido sadio foi realizada usando o algoritmo de agrupamento *K-means* usando a função '*plot_heatmap*' do pacote DEP. A análise de componente principal (PCA) foi realizada como abordagem de análise exploratória de dados em todas as proteínas identificadas com dois ou mais peptídeos únicos. Proteínas diferencialmente abundantes resultantes da comparação superbrotamento *versus* sadio foram identificadas pelo teste t usando *p-value* de 0,05 e *foldchange*>1,5, *Volcano plot* foi obtido usando o pacote ggplot2 (Wickham, 2016) do R.

Para a anotação das proteínas foi utilizado o *software* Blast2GO 5.2.5 (Conesa, et al., 2005). Para comparar e plotar os resultados da anotação GO (Gene Ontology) foi utilizado o banco de dados WEGO - Web Gene Ontology Annotation Plot (<http://wego.genomics.org.cn/>). O diagrama de Venn foi

produzido pelo sistema *online* de Venn (<http://www.interactivenn.net/>). Para identificação das vias metabólicas das proteínas foi utilizado o KEEG (https://www.kegg.jp/kegg/tool/annotate_sequence.html). Para formação das redes de associação proteína-proteína foi utilizado o sistema online *String* (<https://string-db.org/>).

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 Proteínas do guaranazeiro

Conforme descrito na metodologia, um total de 18 extratos proteicos foram obtidos, sendo nove de flores assintomáticas e nove de flores com sintomas de superbrotamento (triplicata para cada clone). A relação observada foi de 4,7 mg/g de proteínas das flores sadias, 5,8 mg/g em flores com superbrotamento. Em análises por SDS-PAGE, os perfis proteicos entre tecidos sadio e tecido doente foram semelhantes. (Apêndice B). . Com base na técnica de *shotgun*, o número total de sequências de peptídeos identificados PSMs (*peptide spectrum matches*) foi de 712.903, e o número de sequências de peptídeos distintas no grupo proteico foi de 264.226 que corresponderam a 4851 proteínas (Tabela 2).

Com base na filtragem foram removidas das análises subsequentes as proteínas identificadas em somente uma das triplicatas biológicas, restando 3404 proteínas. Para as análises de abundância das proteínas os valores de intensidade foram normalizados usando transformação estabilizadora da variância (Figura 20).

A comparação entre as duas diferentes condições de flor doente e flor sadia foi conduzida com base nos valores médios de intensidade das três repetições para cada clone, resultando em um *dataset* composto das médias de cada clone doente ou sadio. As correlações de *Pearson* entre os clones para a condição doente variaram entre 0.895 a 0,926 ($p < 0.05$) e na condição de tecido sadios 0,877 a 0,913 ($p < 0.05$) e quando comparamos as diferentes condições esse valor variou de 0,851 a 0.909 ($p < 0.05$) (Figura 21).

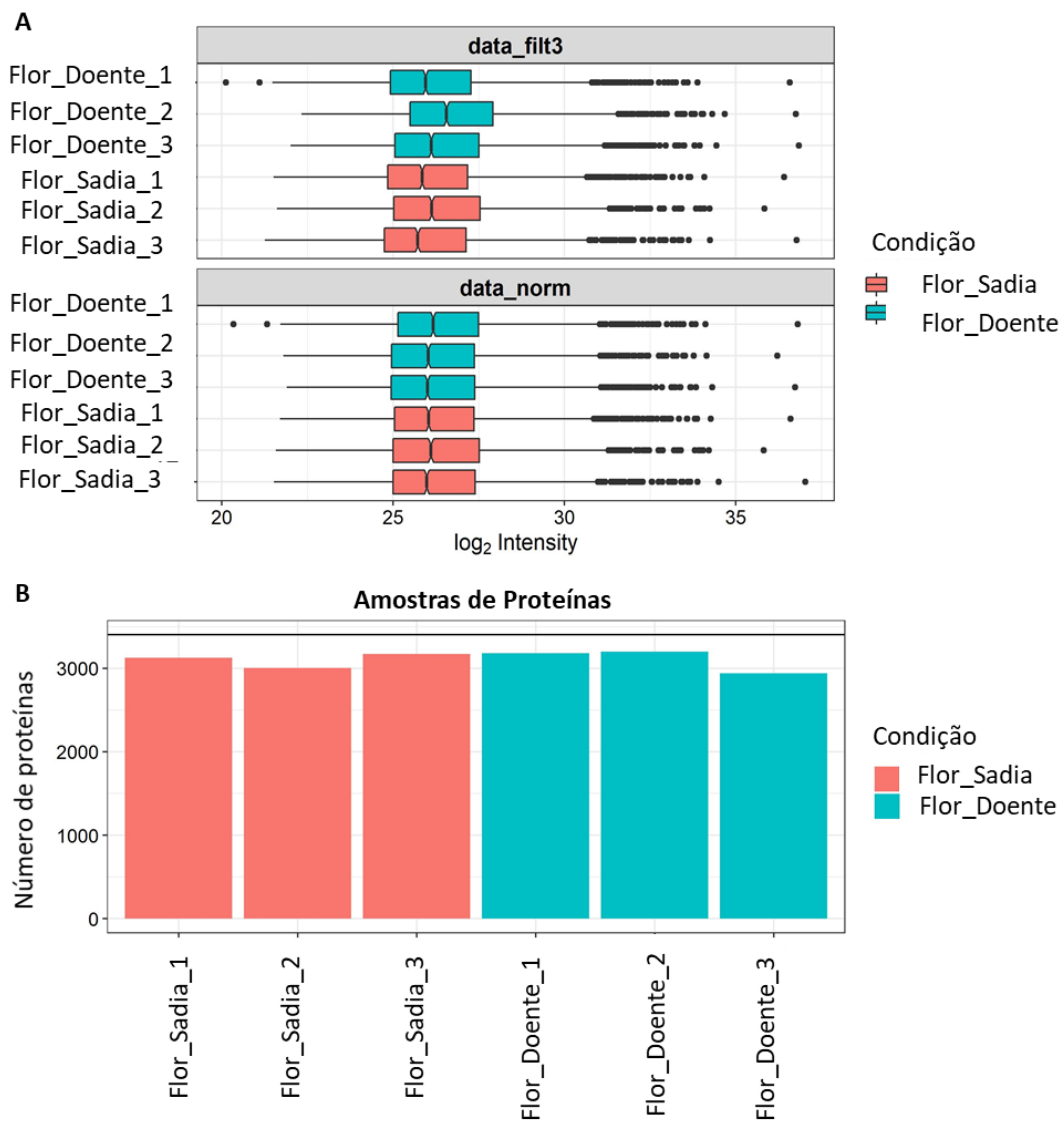


Figura 20 – Perfil proteômico das amostras analisadas. **A** - o gráfico de caixa que representa os dados proteômicos antes e depois da normalização. **B** – números de proteínas por condição experimental

Tabela 2 - Peptídeos mapeados e quantidade de proteínas identificadas nos tecidos floral sintomático e assintomático de diferentes genótipos de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)

Genótipos	Tecido	Peptídeos sequenciados	Peptídeos únicos	Proteínas identificadas
Clone 375	sadio	116812	44336	3126
Clone 375	doente	131600	48288	3180
Clone 613	sadio	111565	41372	3002
Clone 613	doente	122690	45562	3199
Clone 626	sadio	109386	44515	3173
Clone 626	doente	120850	40585	2941
Total		712903	264226	3404

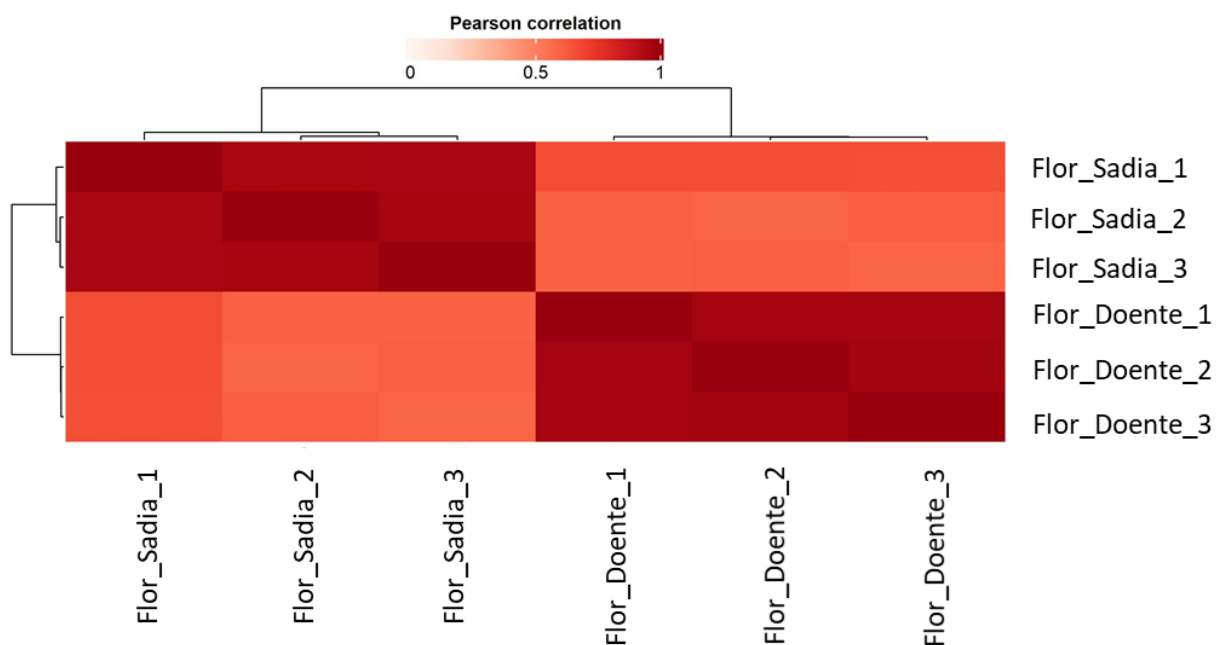


Figura 21 – Heatmap da correlação de *Pearson* entre as amostras das diferentes condições analisadas

9.2 Proteínas diferencialmente abundantes

Foram identificadas 253 proteínas diferencialmente abundantes dentre as 3404 proteínas, consideramos somente as proteínas com *p-value* de 0,05 e *foldchange*>1,5, das proteínas diferencialmente abundantes 137 estão *up-regulated* e 116 *down-regulated* no tecido com superbrotamento (Figura 22) quando comparadas entre flores sadias e com superbrotamento. Entre as proteínas diferencialmente abundantes, *up-regulated* em tecidos sintomáticos estão 18 proteínas diretamente relacionadas ao ciclo celular, o que corrobora com a anatomorfologia dos sintomas de superbrotamento que tem como uma das características a proliferação e multiplicação celular desordenada. Também foram identificadas 2 (duas) proteínas associadas a resposta de defesa, 14 ao metabolismo secundário e 6 (seis) relacionadas ao metabolismo do peróxido de hidrogênio. No caso de síntese de H₂O₂ o acúmulo na célula pode ser uma resposta ao estresse. Além disso, o peróxido de hidrogênio tem a capacidade de se difundir pelas membranas e estudos indicam que pequenas aplicações ajudam a aumentar a resistência da planta a fatores de estresse, neste estudo ao que parece a up regulação destas proteínas em tecido doentes é uma tentativa de combate ao patógeno (Blokhia e Fagerstedt, 2010; Foyer e Noctor, 2003).

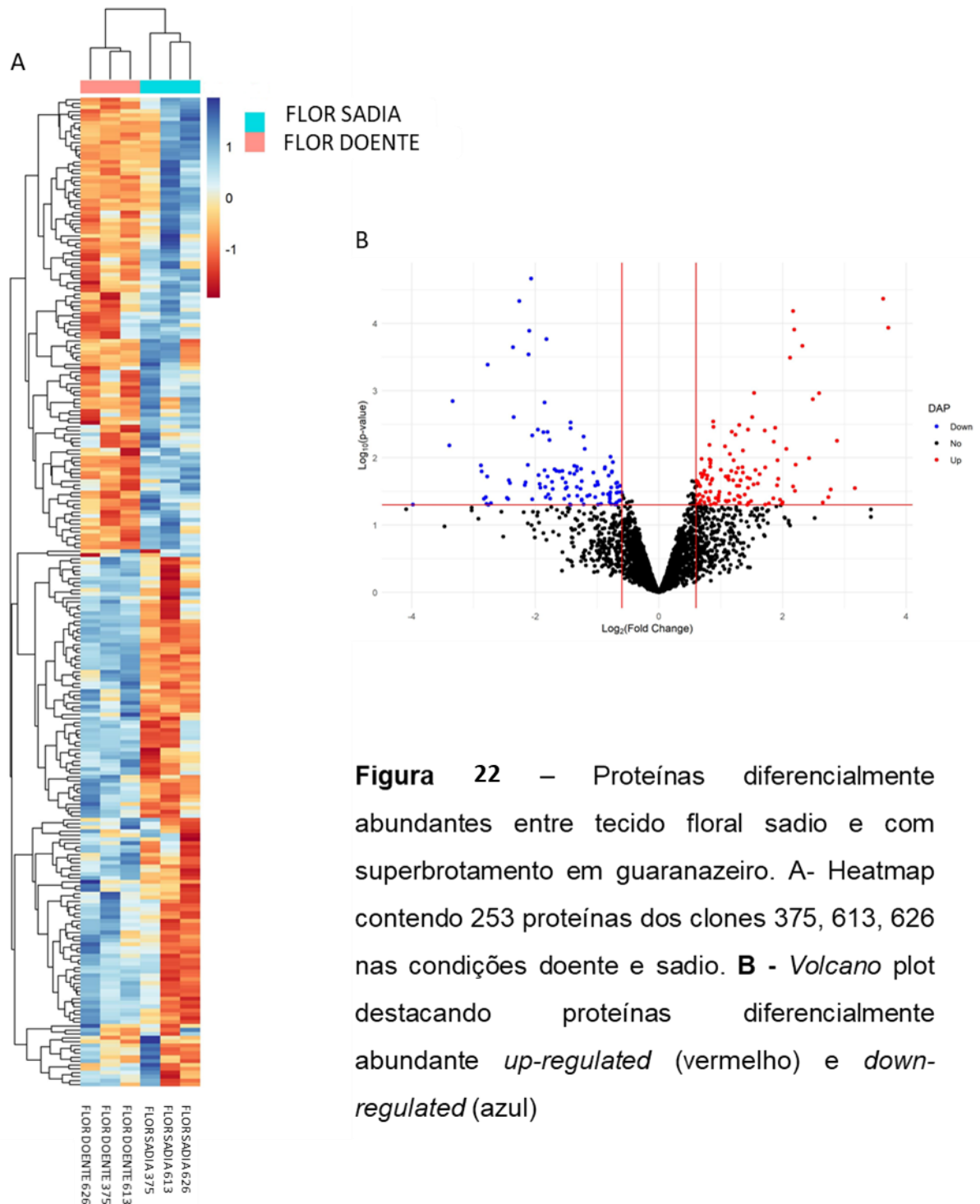


Figura 22 – Proteínas diferencialmente abundantes entre tecido floral sadio e com superbrotamento em guaranazeiro. **A**- Heatmap contendo 253 proteínas dos clones 375, 613, 626 nas condições doente e sadio. **B** - *Volcano* plot destacando proteínas diferencialmente abundante *up-regulated* (vermelho) e *down-regulated* (azul)

Com base no *Gene Ontology* as 253 proteínas diferencialmente abundantes entre os clones de guaranazeiro com e sem sintomas de superbrotamento foram classificadas de acordo com sua função molecular, componente celular e processos biológicos.

As proteínas foram separadas de acordo com sua função molecular em três categorias: proteínas de ligação, atividade catalítica e atividade estrutural (Figura 23). Proteínas relacionadas com a biossíntese de carboidrato, transporte de cálcio e ribossômicas, bem como actina, ligases e calmodulina que medeia o controle de muitas enzimas como quinase e fosfatase, além de proteínas componente do complexo do fator de montagem da cromatina (CAF-1-Chromatin Assembly Factor 1 complex) que tem como função a montagem da cromatina após replicação do DNA e reparo do DNA.

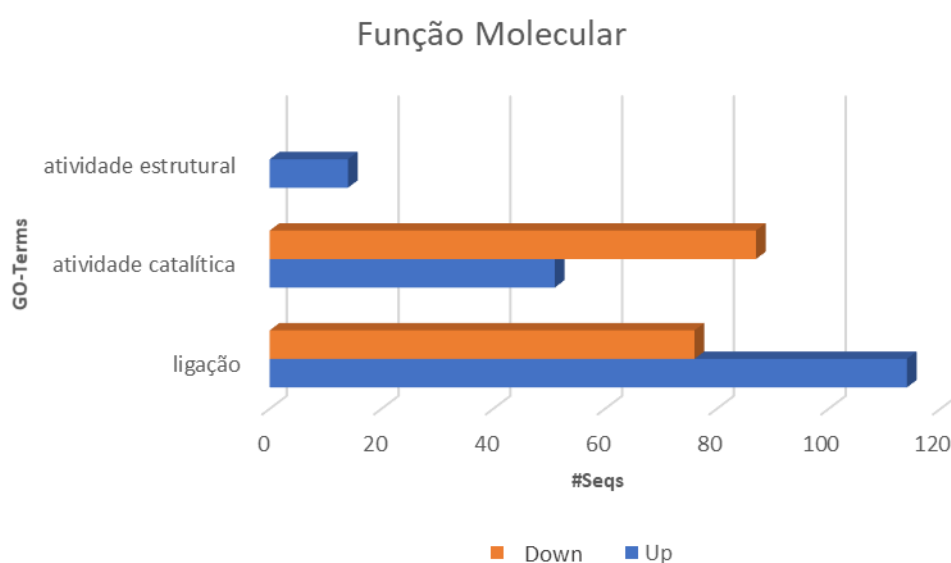


Figura 23 – Classificação funcional da função molecular e sua distribuição de acordo com anotação do *Gene Ontology* das proteínas diferencialmente abundantes em tecido floral com superbrotamento em guaranazeiro

De acordo com os processos biológicos, as proteínas foram classificadas em 17 categorias (Figura 24). As proteínas diferencialmente abundantes, identificadas com a função de regulação nos tecidos doentes, estão relacionadas principalmente a proliferação celular como: PCNA 1 (*proliferating cellular nuclear antigen 1*), Calmodulin-1 (CAM1) e cinco proteínas do complexo MCM (Figura 25), (Tabela 3) e (Apêndice C).

A calmodulina (CAM1) e os sistemas de sinalização dependentes de Ca^{+} estão relacionados ao controle da proliferação celular, morte celular

programada e autofagia de vertebrados. Em plantas, CAM está envolvida na modulação de fatores de transcrição como MYB TFs. Estas proteínas regulam vários aspectos do crescimento e desenvolvimento, tais como ciclo celular, morfogênese e metabolismo secundário em plantas (Berchtold et al 2014, Viridi et al 2015; Tai et. al., 2019).

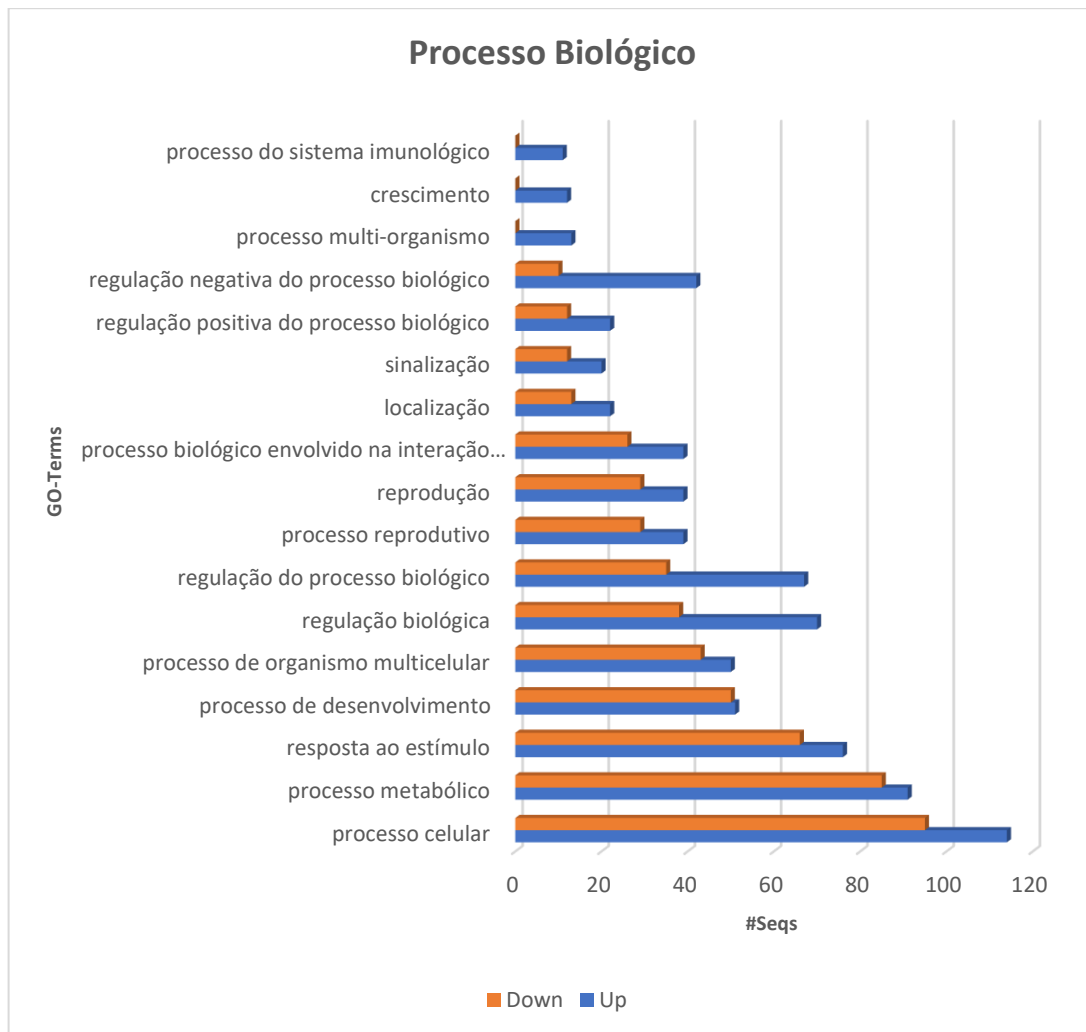


Figura 24 – Representação da classificação funcional no processo biológico e sua distribuição de acordo com anotação do *Gene Ontology* das proteínas diferencialmente expressas em flor doente de guaranazeiro

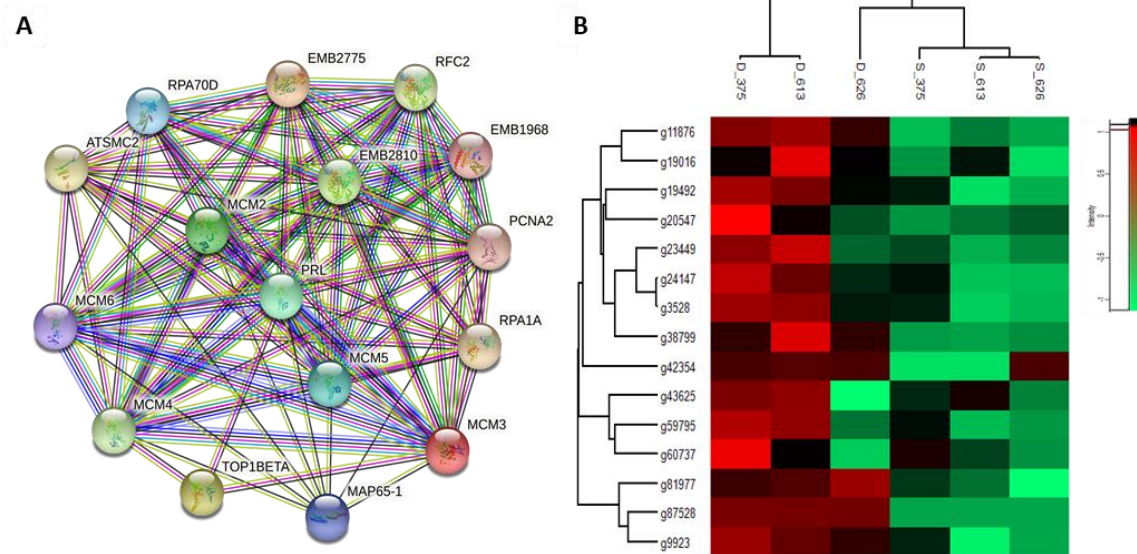


Figura 25 – Proteínas relacionadas ao ciclo celular diferencialmente abundantes em flor doente de guarazeiro. **A** - Análise de redes moleculares dessas proteínas **B** - Heatmap das proteínas relacionadas ao ciclo celular diferencialmente abundante em flor doente

Tabela 3 – Listas das proteínas relacionadas ao ciclo celular diferencialmente abundantes em flor doente de guarazeiro

IDs Proteínas guarazeiro	IDs Proteína	<i>p-value</i>
g38799	<i>MCM2</i>	9.489629
g3528	<i>MCM3</i>	9.735062
g59795	<i>MCM4</i>	8.863369
g19492	<i>MCM5</i>	11.40135
g9923	<i>MCM6</i>	9.020719
g24147	<i>PRL</i>	8.719481
g20547	<i>PCNA2</i>	8.691655
g60737	<i>RFC2</i>	6.707216
g19016	<i>EMB1968</i>	1.600847

g81977	<i>EMB2810</i>	9.900897
g11876	<i>EMB2775</i>	8.434484
g23449	<i>MAP65-1</i>	9.043964
g60493	<i>RPA1A</i>	10.17785
g87528	<i>ATSMC2</i>	1.121401
g43625	<i>TOP1ALPHA</i>	8.369196

Proteínas do complexo MCM estão presentes na divisão celular pois são essenciais para replicação do DNA, elas funcionam como uma helicase de DNA sendo essencial a iniciação e alongamento da replicação DNA, a presença diferencialmente abundante de proteínas relacionadas a proliferação celular encontrada no tecido doente ajudam a explicar a morfologia observadas nos tecidos com superbrotamento.

Já a proteína PCNA1 participa do processo de divisão celular de fungos, plantas e animais regulando o ciclo celular e / ou replicação do DNA e em outros processos envolvendo o genoma, esta proteína funciona como um grampo deslizando para DNA polimerase e, portanto, é chave na replicação do DNA. Ela também está envolvida no reparo do DNA, na manutenção de regiões heterocromáticas durante a replicação, na regulação do ciclo celular e na morte celular programada (Raynaud et al 2006, Strzalka et al 2010; Hirakawa et al.,2017; Cabral et al., 2021).

As proteínas dos componentes celulares foram separadas de acordo com a anotação do *Gene Ontology* em duas categorias: complexo protéico sendo 59 *up* e 15 *downregulated* e proteínas relacionadas à anatomia celular 125 *up* e 101 *downregulated* (Figura 26).

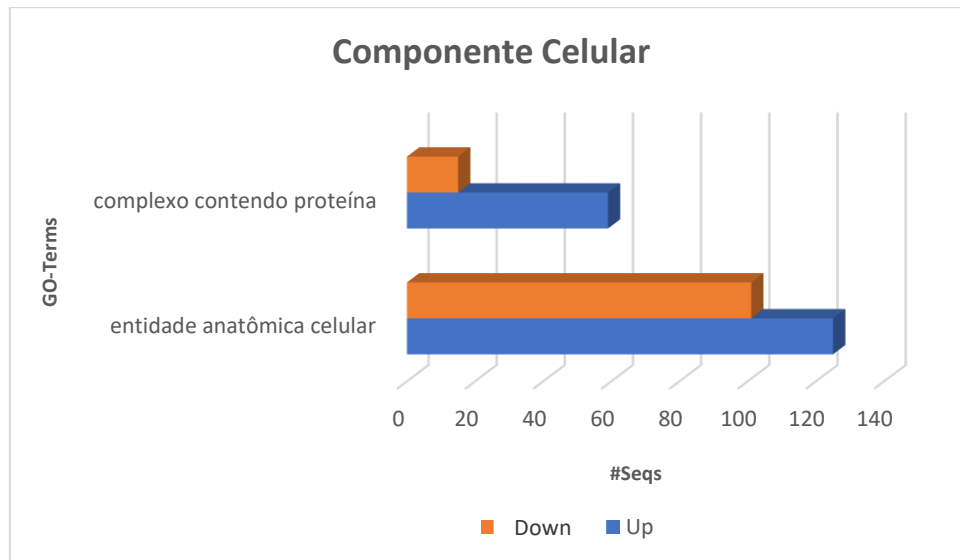


Figura 26 - Representação da classificação funcional do componente celular e sua distribuição de acordo com o *Gene Ontology* das proteínas diferencialmente abundantes em tecidos com superbrotamento em guaranazeiro

9.3 Identificação das proteínas diferencialmente abundantes relacionadas a hormônios vegetais

Neste estudo, proteínas diferencialmente abundantes relacionadas aos conjugados de auxina *IAR3* (g32672) e *IAGLU* (g24494) que fazem conjugação irreversível de AIA-Glu, a proteína *AGO10* (g32670) que é um regulador negativo de auxina, ou seja, tem a função de baixar o teor de auxina no tecido. Interessantemente, essas proteínas estão *up-regulated* nos tecidos saudáveis dos genótipos 626 e 613, enquanto no 375 elas aparecem *down-regulated*. Já nos tecidos infectados pelo patógenos, estas proteínas se mostram reprimidas, indicando que nos tecidos infectados a planta apresenta dificuldades em utilizar mecanismos de homeostase hormonal, pois essas enzimas são importantes para regular o teor de auxina no tecido.

As proteínas *SKP1* (g79904), *Cullin* (g535, g44062), *F-BOX* (g8250), *E1, E2* (g35393, g57567), que compõem o mecanismo SCF de resposta a auxina estão diferencialmente abundantes nos tecidos com superbrotamento, indicando que este mecanismo está ativo nos tecidos doentes (Figura 27), (Tabela 4).

Proteínas relacionadas a hormônios

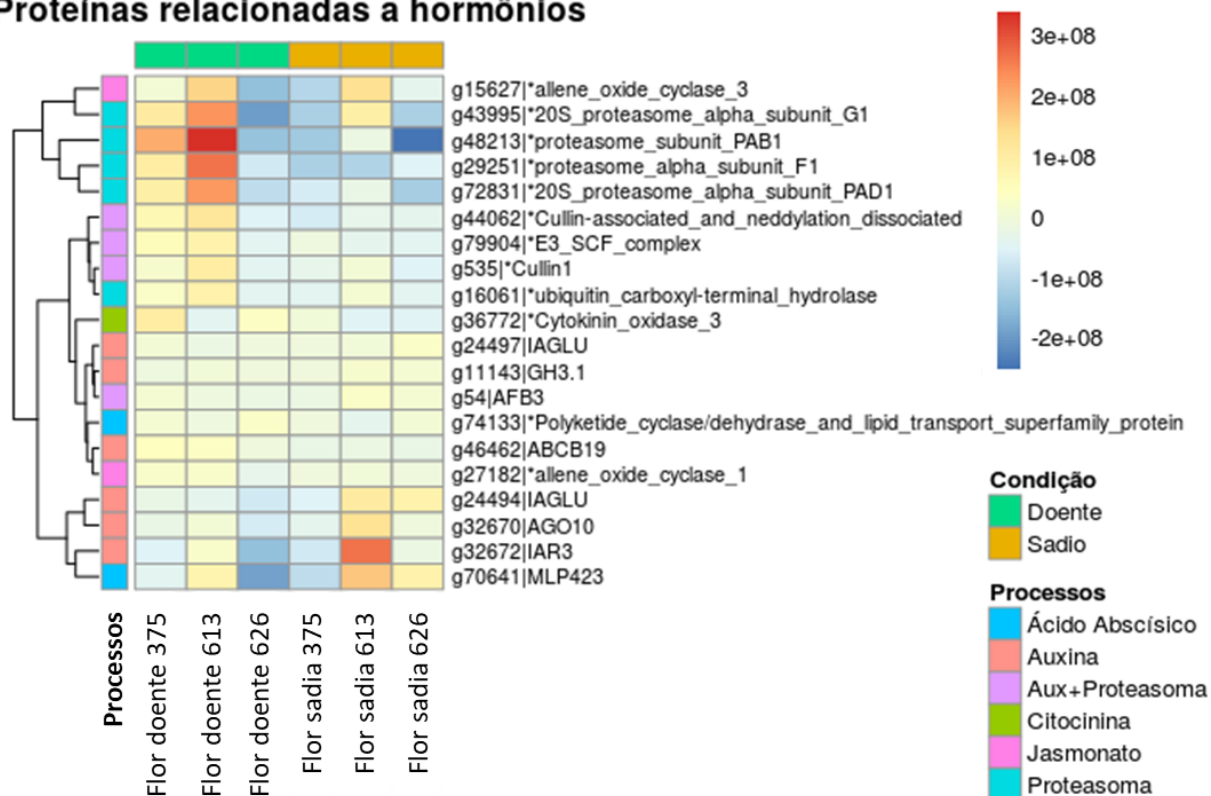


Figura 27 – Heatmap das proteínas diferencialmente abundantes relacionadas aos hormônios vegetais

O mecanismo SCF de resposta à auxina está diretamente relacionado com o processo de degradação de proteínas repressoras da resposta a auxina. Essas proteínas são marcadas e direcionadas ao proteossomo. O fato de ter encontrado proteínas do proteossomo e do mecanismo SCF *up-regulated* no tecido sintomático apenas nos clones 375 e 613, e no genótipo 626 estas proteínas estarem *down-regulated*, indica que possivelmente a maior habilidade em regular a auxina pode levar a um menor requerimento do mecanismo SCF, sugerindo que desbalanço de auxina no clone 626 não é tão drástico como nos outros dois clones, o que corrobora com as observações no campo, pois o clone 626 é o menos suscetível ao superbrotamento.

Tabela 4 – Relação de proteínas identificadas da interação que compõe o mecanismo SCF

Nome das Proteínas	IDs guaranazeiro	<i>Foldchange</i>	<i>p-value</i>
SKP1	g79904	1,702	1,283
Cullin	g535	1,405	1,848
Cullin	g44062	1,156	1,773
F-BOX	g8250	1,852	1,622
E2	g57567	1,476	1,607
RBX1	g35393	1,714	3,196

Dados genômicos, transcriptômicos e metabolômicos, indicam que *F. decemcellulare* é capaz de produzir AIA, que é a principal auxina encontrada em planta (Lobo, 2016). Assim, a hipótese testada neste trabalho é que a auxina produzida pelo patógeno, juntamente com a auxina endógena produzida pela planta provocam um desequilíbrio hormonal que pode resultar nos sintomas observados de superbrotamento.

A literatura descreve que diversos patógenos como bactérias, insetos e fungos - possuem a habilidade de produzir hormônios como auxina, no processo de infecção do hospedeiro. Em plantas, a auxina e citocinina são responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento da planta, porém durante a interação patógeno-hospedeiro a produção de auxina por parte do patógeno soma-se à produção por parte da planta, levando ao acréscimo de auxina no tecido. Com esse acúmulo, ocorre um desequilíbrio hormonal podendo ocasionar o aparecimento de sintomas como galhas, promovendo uma proliferação celular localizada, multiplicação de órgãos e espessamento dos tecidos como observados no complexo de superbrotamento de guaranazeiro (Lee et al., 2009; Yamagushi et al., 2012; Bartlett e Connor, 2014; Teixeira et al., 2014).

Diante do desbalanço hormonal, as plantas desenvolveram diferentes estratégias como produção de conjugados de auxina. Esses conjugados como AIA-Ala e AIA-Leu podem ser hidrolisados liberando a auxina

ativa que pode ser utilizada pela planta de forma tardia. Esses conjugados são conhecidos como reversíveis, outros conjugados são irreversíveis como AIA-Asp e AIA-Glu, essas ligações não são desfeitas, inativando as auxinas permanentemente (Naser, et. al.,2016; Fu et. al., 2019; Blakeslee, et. al.,2019).

9.4 – Proteínas relacionadas à síntese e catabolismo de Poliaminas

Dentre as proteínas *up-regulated* no tecido com superbrotamento foram identificadas 3 (três) proteínas homólogas a S-adenosilmetionina sintase (g79955, g1181, g1184), essas proteínas estão envolvidas em diversos processos celulares estando presentes em todos os organismos vivos, tendo como função a síntese de S-adenosilmetionina (SAM), que é essencial para metilação, transcrição, proliferação celular e produção de metabólitos (Yoon et al., 2012, Moffatt et al., 2001).

Relacionado a biossíntese de GABA ainda identificados nos tecidos infectados 6 (seis) com síntese de poliaminas, 3 (três) proteínas homólogas a GAD (g25700, g63840, g63839) e 8 (oito) homólogas a Aldeído desidrogenase (g13375, g26358, g3174, g37119, g37343, g37346, g42394, g78066). Tanto GAD quanto Aldeído desidrogenase participam da síntese de GABA, o primeiro utiliza glutamato, enquanto o aldeído desidrogenase sintetiza GABA a partir do *4-aminobutanal* que é o produto catabólico das poliaminas. Não conseguimos identificar proteínas homólogas a GABA-P (Gaba Permease) que permite a entrada de GABA na mitocôndria para que o mesmo seja catabolizado.

Os sintomas observados em guaranazeiro, incluindo perda da capacidade de alongamento e malformação dos tecidos, também foram observados por Baum et al (1996) associados com níveis extremamente altos de GABA e níveis baixos de glutamato. Baum e colaboradores confirmam que plantas de tabaco transgênico expressando a proteína GAD sem o domínio de ligação CaM apresentam graves anormalidades morfológicas nas plantas, como hastes curtas, nas quais as células do parênquima cortical falham em alongar.

Os resultados obtidos em guaranazeiro sugerem que um possível acúmulo de GABA poderia estar ocorrendo no tecido doente de guaranazeiro e atuando na formação dos sintomas observados (Figura 28).

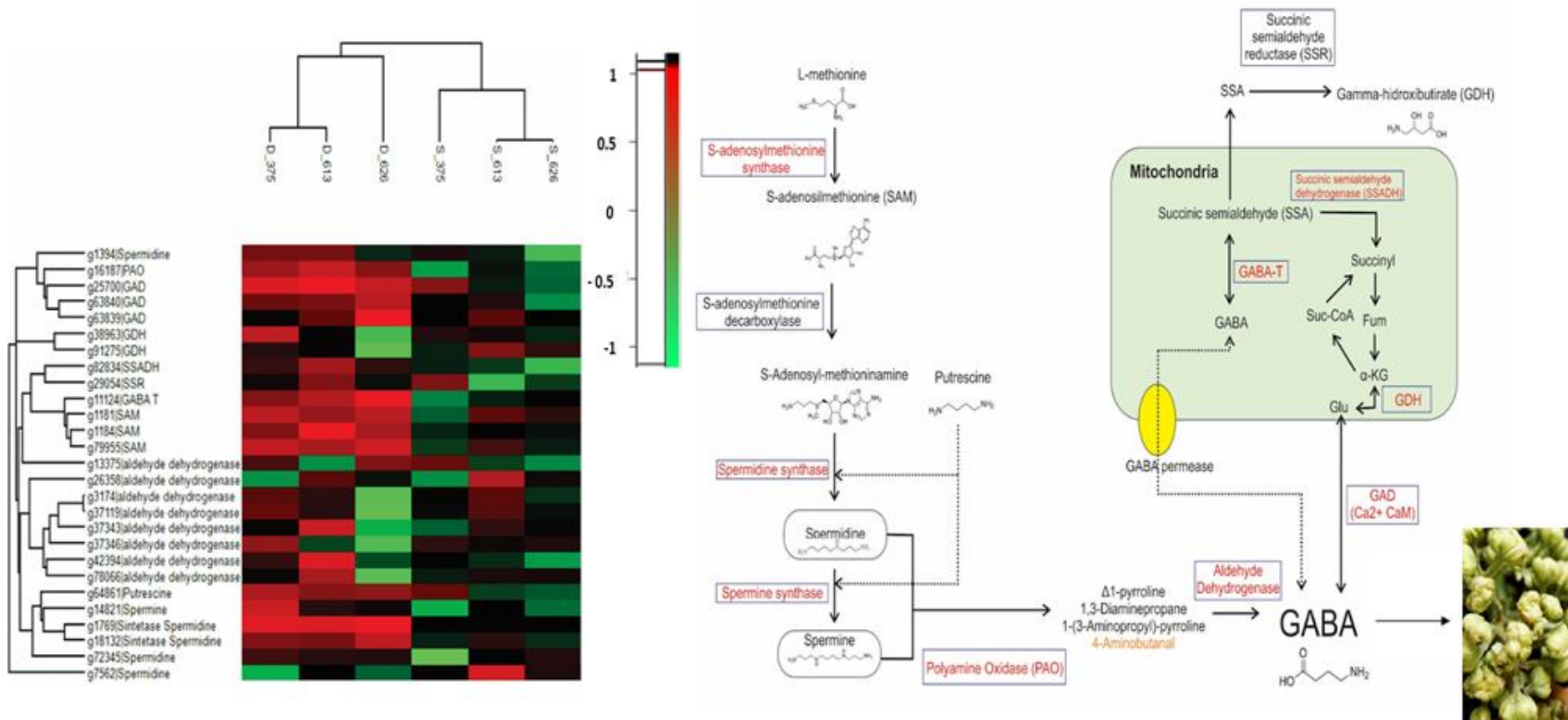


Figura 28 – Heatmap das proteínas relacionadas à síntese e catabolismo de poliaminas e GABA (à esquerda). E à direita, esquema da biossíntese de GABA a partir do catabolismo de poliaminas e metabolismo de glutamato. As proteínas escritas em vermelho representam as proteínas *Up regulated* identificadas neste trabalho.

9.5 Metabólitos secundários responsivos à infecção

Nos tecidos florais com superbrotamento foram identificadas diversas proteínas diferencialmente abundantes, relacionadas ao metabolismo secundário, sendo 6 (seis) proteínas fenilalanina amônia liase (PAL) (g19119, g22869, g31349, g37162, g455, g73663), 5 (cinco) 4-coumarate-CoA ligase (g50131, g6025, g6033, g63524, g67772), 5 (cinco) proteínas relacionadas a chalcona sintase (g28620, g29635, g39659, g48779, g7704), 2 (duas) 2-oxoglutarate 3-dioxygenase (g6734, g6736), 1(um) flavona sintase (g49038), 1(um) Trans-cinnamate 4-monooxygenase e 1(um) terpeno sintase (g35242) (Figura 29).

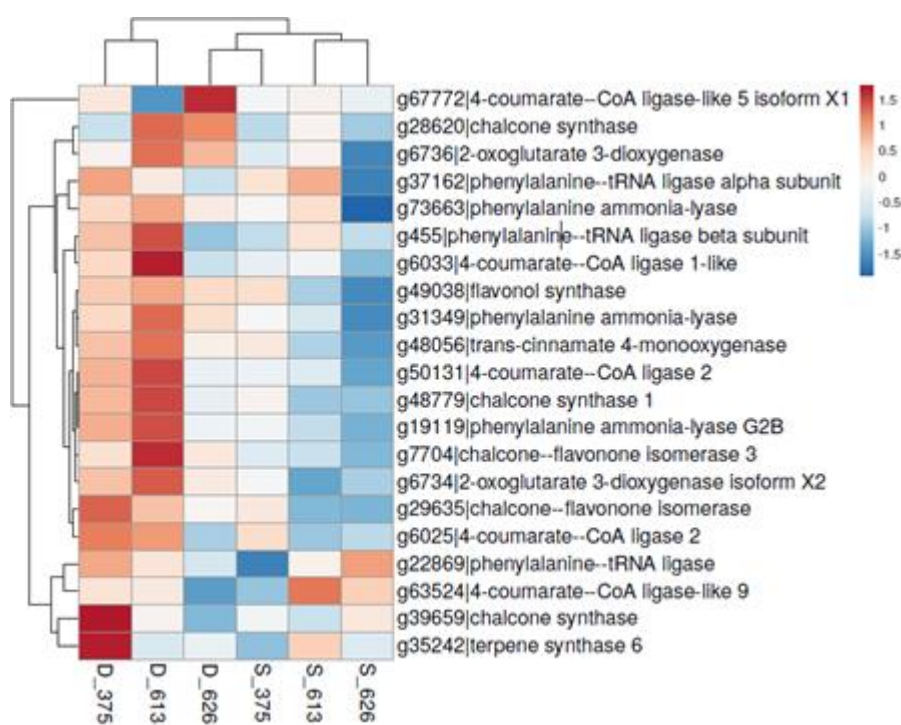


Figura 29 - Heatmap das proteínas relacionadas à biossíntese de compostos fenólicos, e síntese de terpeno.

Ao contrário dos metabólitos primários, os metabólitos secundários de plantas não estão envolvidos diretamente no crescimento, reprodução ou desenvolvimento das plantas embora possa ter função de sobrevivência, pois estão associados a resposta ao estresse biótico e abiótico que as plantas podem vir a sofrer. A ausência deste não resulta em morte imediata, mas sim em prejuízo a longo prazo da capacidade de sobrevivência, desempenhando um

importante papel na adaptação das plantas ao seu ambiente. Por possuírem atividades antifúngicas e antivirais, esses metabólitos foram amplamente estudados e sua atividade associado à capacidade de proteger as plantas de patógenos. Na indústria esses metabólitos são fontes únicas para produtos farmacêuticos, aditivos alimentares, aromas e outros materiais (Fraenke, G.S., 1959; Kossel et al., 1981; Zhao et al., 2005;). Esses metabólitos secundários são classificados de acordo com suas vias biossintéticas em fenólicos, terpenos, esteróides, alcalóides e policetídeos como os flavanoides sintetizados pelas chalconas sintases (Bourgand et al. 2001, Dao et al. 2011).

Entre as proteínas diferencialmente abundantes, identificamos todas as proteínas relacionadas à via de biossíntese de compostos fenólicos a partir de fenilalanina. Em plantas, esses metabólitos são sintetizados a partir da fenilalanina, um produto da rota do ácido chiquímico. Essa fenilalanina é convertida em ácido cinâmico utilizando a fenilalanina amônia liase (PAL). Após uma série de hidroxilações e metilações esse ácido cinâmico sofrendo a ação da enzima Trans-cinnamate 4-monooxygenase (CA4H) pode ser convertido em ácido cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico entre outras. A enzima 4-coumarate-CoA ligase (4CL) por sua vez é responsável pela produção de tioésteres de CoA de uma variedade de ácidos cinâmicos substituídos com hidroxí e metoxi, que são usados para sintetizar vários compostos derivados de fenilpropanóides, incluindo antocianinas, flavonóides, isoflavonóides, cumarinas, lignina, suberina e fenólicos ligados à parede, (Ehltng et al.; 1999, Mialoundama et. Al., 2009; Ahuja et. Al., 2012; Huang et al., 2012; Taniguchi, et. al., 2014) (Figura 30).

Contudo, os dados obtidos revelam que os níveis de abundância destas proteínas nos tecidos infectados são genótipo dependente, visto que a maioria das proteínas não estão *upregulated* no clone 317.

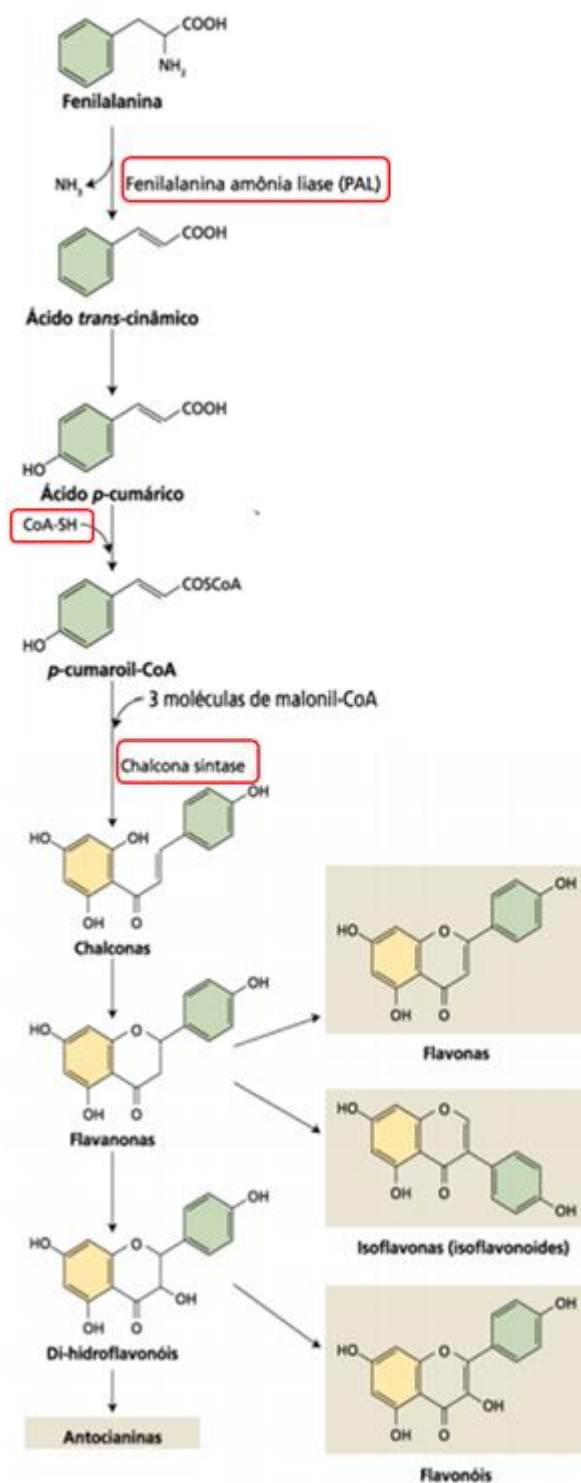


Figura 30 - Esquema da biossíntese de compostos fenólicos a partir de fenilalanina. As enzimas marcadas em vermelho foram identificadas neste estudo. Fonte: Taiz e Zeiger (2013).

Além destas, identificamos 23 proteínas diferencialmente abundantes relacionadas à peroxidase (g14243, g16375, g16890, g16891, g19282, g27862,

g28189, g2989, g33717, g43713, g45473, g48982, g53214, g54409, g54469, g55434, g56921, g6370, g6371, g6372, g73214, g76789, g2967). As peroxidases desempenham um papel fundamental no combate ao estresse oxidativo, sendo responsáveis pela remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peróxido de hidrogênio. Essas proteínas participam também da biossíntese e degradação da lignina respondendo a estresses ambientais como ferimentos e ataque de patógenos, além de auxiliar na manutenção dos níveis normais de IAA na planta através do catabolismo de auxina. Essas funções variam de acordo com a isoforma/isoenzimas e tecido vegetal que se encontram. A maioria dessas proteínas aparecem diferencialmente abundantes nos tecidos doentes sendo a sua maioria no clone 613, nos tecidos saudios aparece 8 (oito) no clone 613, 2(duas) no clone 375 e apenas 1(um) proteína upregulated no clone 626, (Figura 31).

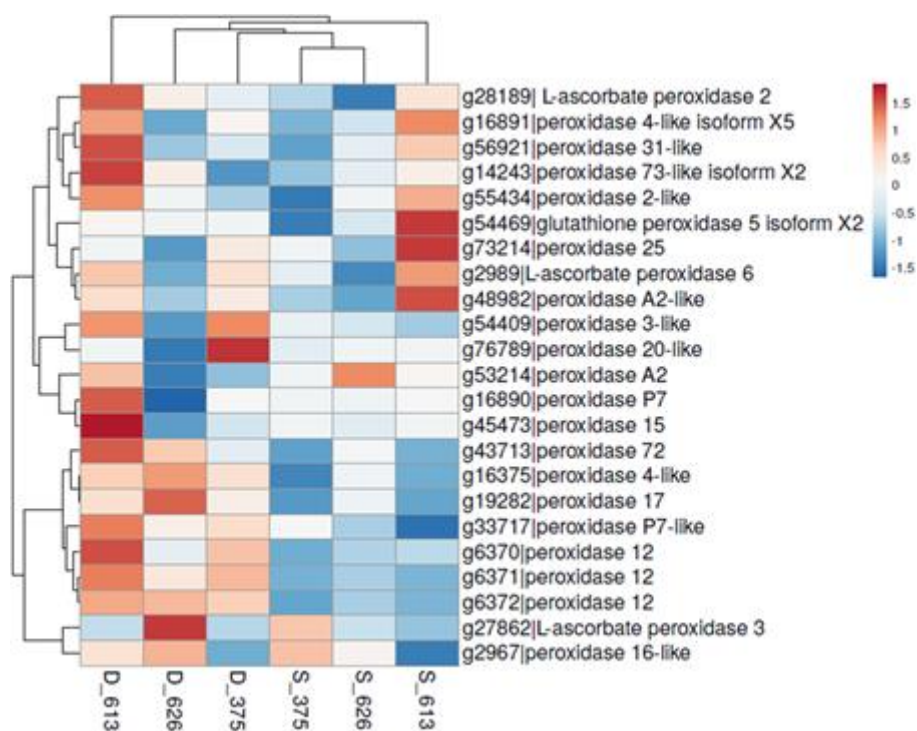


Figura 31 - Heatmap das proteínas relacionadas a peroxidases identificadas no proteoma.

9.6 Identificação das proteínas de *Fusarium decemcellulare* expressas durante a interação

As proteínas de *F. decemcellulare* identificadas durante a interação em flores com sintomas de superbrotamento foram 8.337 PSMs (*peptide spectrum matches*), 7.164 sequências de peptídeos distintas relacionadas a 114 proteínas. Com base na filtragem foram removidas as proteínas identificadas em somente uma das triplicatas biológicas, restando 31 proteínas (Tabela 5), (Figura 32 e 38).

Tabela 5 - Peptídeos mapeados e quantidade de proteínas identificadas de *F. decemcellulare* no tecido floral sintomático de diferentes genótipos de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)

Genótipos	Tecido	Peptídeos sequenciados	Peptídeos únicos	Proteínas identificadas
Clone 375	Flor	3051	2594	49
Clone 613	Flor	2969	2593	46
Clone 626	Flor	2320	1977	42
	Total	8337	7164	137

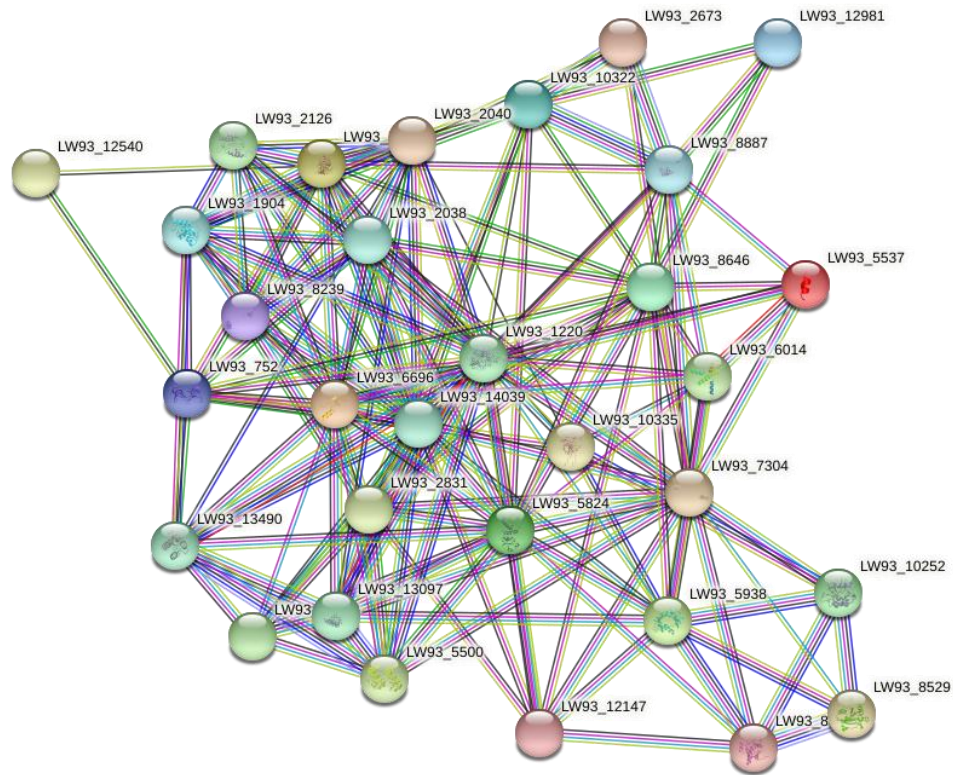


Figura 32 - Análise de redes moleculares das 31 proteínas de *F. decemcellulare* identificadas em flor doente de guaranazeiro

Com base no *Gene Ontology* as 31 proteínas de *F. decemcellulare* identificadas foram classificadas de acordo com sua função molecular, componente celular e processos biológicos. As proteínas foram separadas de acordo com sua função molecular em cinco categorias: sendo 26 proteínas de ligação, 23 relacionadas à atividade catalítica, quatro de atividade estrutural, três de atividade de transporte e oito proteínas de atividade de regulação (Figura 33).

De acordo com o processo biológico, as proteínas foram separadas em nove categorias: 27 proteínas relacionadas ao processo metabólico, 26 relacionadas ao processo celular, sete de regulação biológica, seis de localização, seis de regulação do processo biológico, três de regulação biológica positiva, três proteínas relacionada a resposta a estímulos, duas de sinalização e duas proteínas associadas ao processo de desenvolvimento (Figura 34).

As proteínas classificadas de acordo com componente celular foram separadas em duas categorias, ficando 20 proteínas relacionadas à anatomia celular e 14 proteínas relacionadas ao complexo protéico (Figura 35).

Proteínas relacionadas ao complexo de F1, V1 e A1 de F-, V-e A-ATPases, esse complexo constitui a ATP sintase, enzima responsável pelo fornecimento de energia para o funcionamento celular, além desta, identificamos duas helicases, uma histona e três proteínas de fator de alongamento, a EF1A (g727_FD307, g7980_FD307 e a putativa EF2 que corresponde a g9233_FD307).

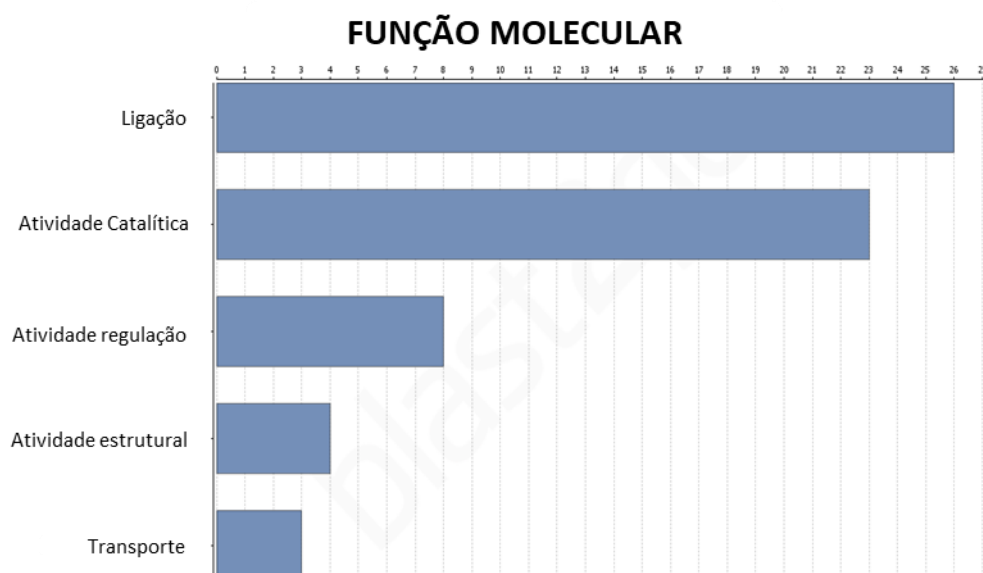


Figura 33 – Representação da classificação funcional da função molecular e sua distribuição de acordo com o *Gene Ontology* das proteínas de *F. decemcellulare* em tecidos com superbrotamento em guaranazeiro

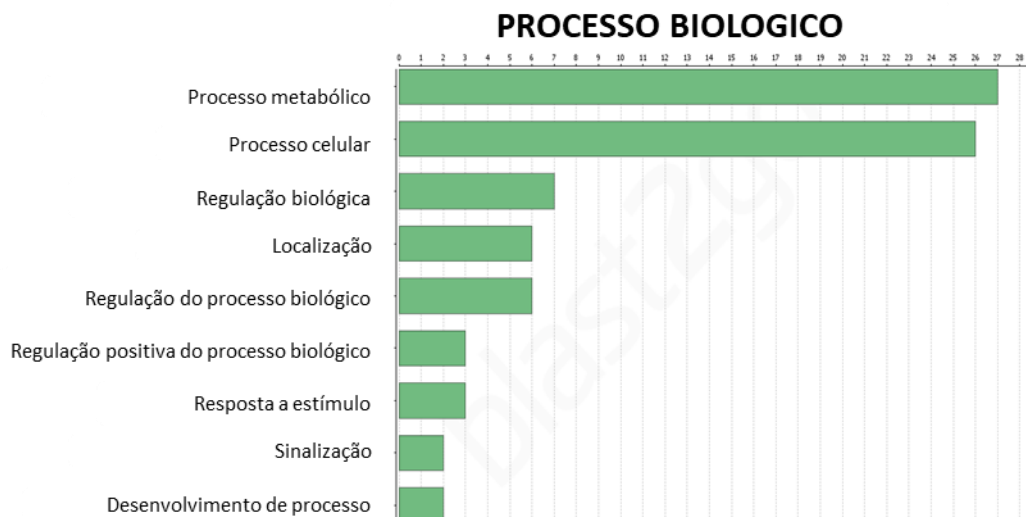


Figura 34 - Representação da classificação funcional do processo biológico e sua distribuição de acordo com o *Gene Ontology* das proteínas de *F. decemcellulare* em tecidos com superbrotamento em guaranazeiro

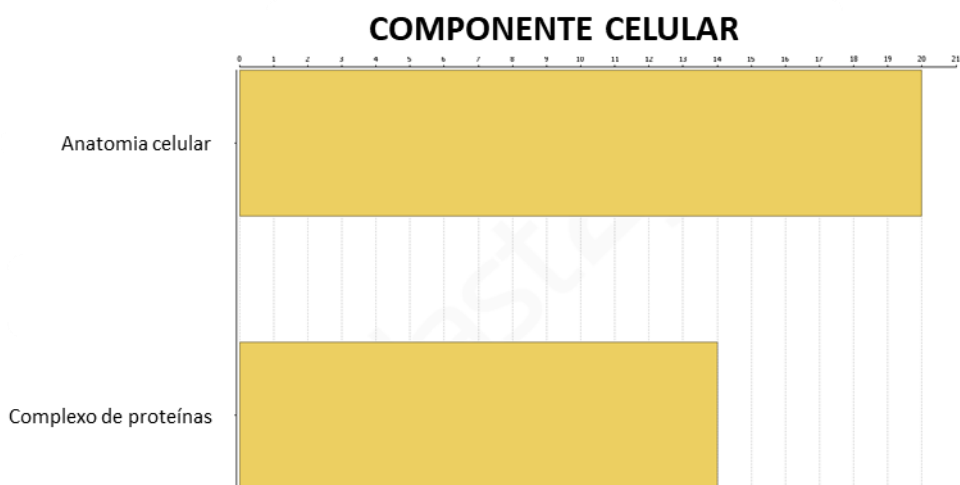


Figura 35 - Representação da classificação funcional da componente celular e sua distribuição de acordo com o *Gene Ontology* das proteínas de *F. decemcellulare* em tecidos com superbrotamento em guaranazeiro

De acordo com análise de interação patógeno-hospedeiro do *Phi-base 5* (cinco) das 31 proteínas identificadas em *F. decemcellulare* correspondem a proteínas efetoras (g15127_ FD307, g15355_ FD307, g3981_ FD307, g6117_ FD307 e g9022_ FD307) (Figura 36).

Entre essas proteínas efetoras identificamos uma proteína homóloga a Ca^{2+} /calmodulin CAM (g9022_FD307), essa proteína está envolvida em uma variedade de processos fisiológicos, como desenvolvimento fúngico, esporulação, germinação de esporos, orientação e ramificação de hifas além de formação de apressórios, contribuindo para colonização e patogenicidade do fungo (Bencina et al., 2005; Steinbach et al., 2006; Brand et al., 2007). O silenciamento do gene Ca^{2+} /calmodulin CAM (MGG06884.5) no fungo *M. oryza* causou graves defeitos no crescimento, baixa produção de conídio, baixa formação de apressório e quase nenhuma patogenicidade contra as plantas hospedeiras (Nguyen, et al., 2008).

Foi identificado também a proteína Ypt7 (*Ypt/Rab-type GTPase*) (g6117_FD307) classificada pelo *Phi-base* como efector, essa proteína é responsável pela regulação do tráfico de membranas, é essencial para morfogênese fúngica, fusão de vacúolo, autofagia, resistência ao estresse e patogenicidade do fungo (Zheng et al., 2007; Zheng et al., 2009; Chen et al., 2008). Mutantes Δ MoYPT7 em *M. oryzae* com o gene Ypt7 silenciado apresentaram defeitos marcantes na formação de hifas, conídios e apressórios diminuindo significativamente a patogenicidade de *M. oryzae* em plantas de arroz (Liu, et al., 2015).

A proteína g15355_FD307 apresentaram homologia a proteína PEX6 (*Fator de biogênese peroxissomo 6*), descrita como essencial para a infecção fúngica participando da formação de apressório na patogênese. Estudos de Kimura, (2001), com deleção do gene PEX6 em *Colletotrichum lagenarium* demonstraram evidências diretas de que as funções metabólicas dos peroxissomos, especialmente β -oxidação de ácidos graxos, são essenciais para a infecção mediada por apressório em patógenos fúngicos.

Outra proteína efetora identificada foi a *Rab/GTPases* (g10941_FD307) que desempenha um papel central no transporte de vesículas em células eucarióticas, além de estar envolvida em processos essenciais, incluindo exocitose, endocitose e diferenciação celular, no estudo de Siriputthaiwan (2005) utilizando mutante para *Rab/GTPase* do patógeno de feijão *Colletotrichum lindemuthianum*, viram que essas linhagens apresentaram

uma redução severa da patogênese e não foram capazes de penetrar nas células hospedeiras, esses resultados indicaram que o *Rab/GTPase* é essencial para a patogênese fúngica, regulando o transporte intracelular de vesículas envolvidas no envio de proteínas ao meio extracelular e diferenciação de estruturas infecciosas

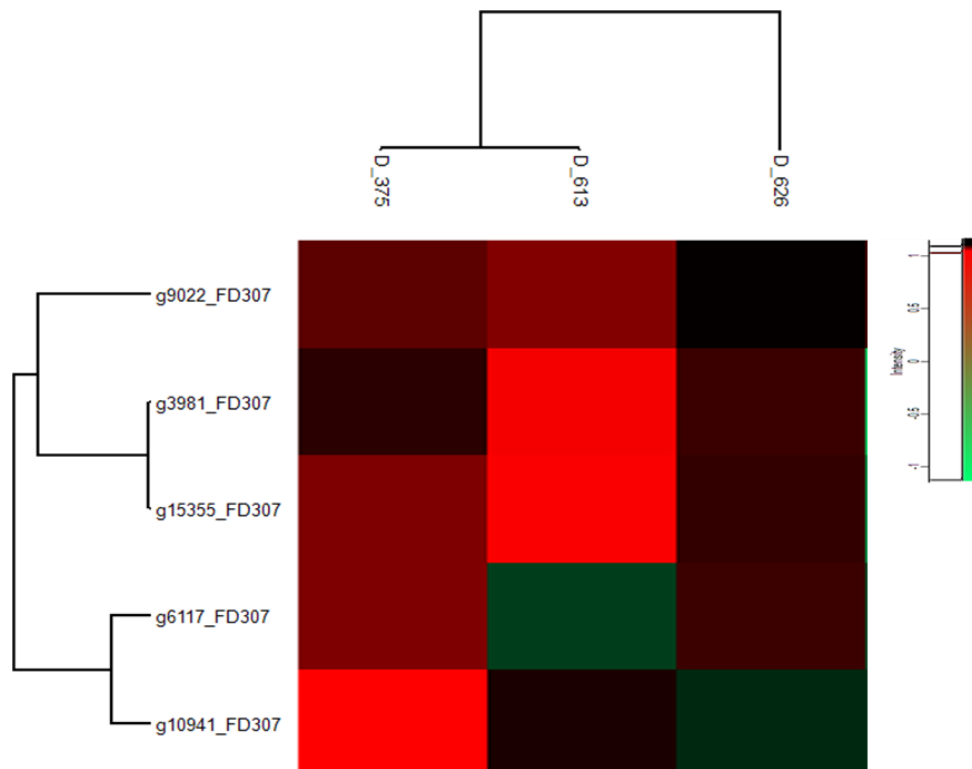


Figura 36 - Heatmap das proteínas preditas efetores em *F. decemcellulare*

Entre as proteínas de *F. decemcellulare* identificamos uma *Spermidine synthase* (g10815_FD307) uma enzima-chave envolvida na biossíntese de poliamina. Vários estudos relacionam a biossíntese de poliaminas por patógenos durante a interação, no trabalho de Hwezi et al. (2010) com a interação do nematóide *heterodera schachtii* com *Arabidopsis thaliana*, constatou que o nematoide produz a proteína efetora 10A06, e que essa proteína ativa a espermidina sintase (SPDS2) na planta, elevando os níveis de espermidina. No estudo de Vilas, et al., 2018 investigando a interação de plantas de tomate e *Pseudomonas syringae* constatou que a biossíntese e o

catabolismo da poliaminas são ativados tanto no tomate quanto nas bactérias durante a interação patogênica.

No caso do *F. decemcellulare*, não identificamos proteínas homólogas ao 10A06 porém encontramos uma espermidina sintase indicando que possivelmente o patógeno esteja utilizando desta mesma estratégia. Por possuir a habilidade de sintetizar a espermidina, o patógeno não precisaria ativar essa síntese na planta. A produção de espermidina por parte do patógeno elevaria o teor de poliaminas na planta e conseqüentemente a quantidade de poliaminas conjugadas e a atividade de poliamina oxidases (PAO), o que possivelmente resultaria na suscetibilidade do guaranazeiro. Diversos estudos apoiam a ideia de que a oxidação de poliaminas é importante para a defesa vegetal, e que as poliaminas oxidases (PAOs) intracelulares são fundamentais para o resultado final da interação planta-patógeno, porém ainda não há um consenso como isso ocorre (Marina et al., 2008; Gonzalez et al., 2011; Morales, et al., 2016; Jasso-Robles et al., 2020). Curiosamente a proteína espermidina sintetase não aparece expressa na interação entre *F. decemcellulare* e o clone 375, esse clone como já foi mencionado anteriormente apresenta uma maior suscetibilidade ao superbrotamento, em contrapartida essa proteína aparece mais abundante nos clones 613 e 626 (Figura 37).

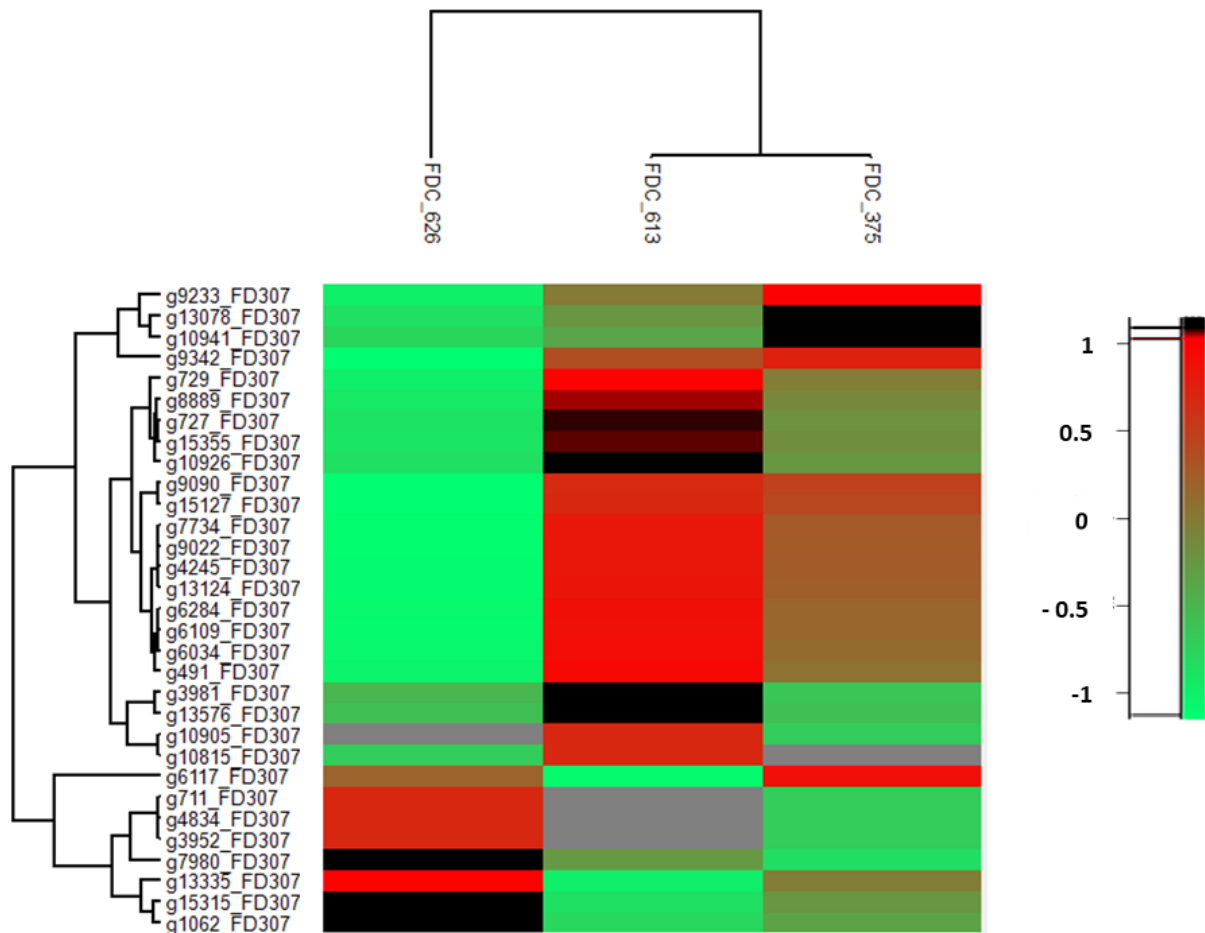


Figura 37– Heatmap das 31 proteínas de *F. decemcellulare* identificadas na interação de tecido de flores com superbrotamento

No clone 375 encontramos diferencialmente abundantes proteínas relacionadas ao fator de alongamento (g9233_FD307), ribossomal (13078_FD307), rab11B (g10941_FD307) um regulador do tráfico de membranas intracelulares e a g9342_FD307 que corresponde a proteína 26S proteossomo responsável pela degradação das proteínas ubiquitinadas. No clone 626, identificamos o g7980_FD307 que corresponde a um fator de alongamento, g15315_FD307 proteína homóloga a histona H4.1, g3952_FD307 uma ATPase e a g13335_FD307 que corresponde a uma Rab7, é uma proteína de transporte que desempenha um papel crucial na infecção e sobrevivência do patógeno. No trabalho de Zheng et al., 2018 analisando mecanismo de autofagia em *F. graminearum* identificaram a proteína (FgAtg9) essencial para autofagia e

demonstraram que o tráfico desta proteína é mediado por Rab7. Esse mecanismo é essencial para colonização do fungo pois desempenha papéis importantes no crescimento vegetativo, desenvolvimento de hifas aéreas, metabolismo lipídico e patogenicidade em *F. graminearum*. A maioria das proteínas estão *up-regulated* no clone 613, dentre essas podemos citar as proteínas relacionadas divisão celular a CDC48 (g15355_FD307), fator de iniciação (g727_FD307), proteínas de síntese de ATP (g10926_FD307), helicase eif4A, proteína de choque térmico (g3981_FD307), uma Box helicase (g13576_FD307).

10. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho pode se concluir que a análises transcriptômicas e proteômica da interação apoiam a ocorrência do desequilíbrio hormonal no superbrotamento causada por *F. decemcellulare*. A evidência de que esse patógeno produz IAA, indica uma das possíveis causas das alterações nos níveis hormonais da planta, assim como surgimento dos sintomas de superbrotamento que tem como característica principal a proliferação celular excessiva levando a malformações do tecido e aparecimento de galhas nas plantas.

Além disto conseguimos identificar diferencialmente abundante no tecido infectado uma espermidina sintase secretada pelo *F. decemcellulare* indicando que possivelmente o patógeno esteja elevando os níveis de espermidina na planta, bem como atividade de poliamina oxidases (PAO), deixando a planta mais suscetível a infecção. A produção de espermidina sintase por parte do patógeno elevaria o teor de poliaminas na planta e consequentemente a quantidade de poliaminas conjugadas e a atividade de poliamina oxidases (PAO) o que possivelmente resultaria na suscetibilidade do guaranazeiro, além disto o excesso de poliamina oxidases (PAO) estaria diretamente relacionada a síntese de ácido *gama-aminobutírico* (GABA), sugerindo que possa estar ocorrendo o acúmulo de GABA no tecido doente tendo como consequência a mal formação nos tecidos infectados, corroborando

com essa hipótese proteínas relacionadas a biossíntese de GABA estão *Up regulated* apenas no tecido doente.

Análise posteriores de quantificação do ácido *gama-aminobutírico* (GABA) em tecidos sadios e doentes são necessárias.

11. REFERENCIAS

- ACOSTA, I. F., Gasperini, D., Chételat, A., Stolz, S., Santuari, L., & Farmer, E. E. (2013). Role of NINJA in root jasmonate signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(38), 15473-15478.
- ANDERSON, N. G.; Anderson, N. L. Twenty years of Two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis*, v. 17, p. 443-453, 1996.
- ANDREWS S (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. 19 Jun. 2018.
- ÂNGULO SM, Villapudua JR (1982) Buba of mango (*Mangifera indica* L.) in the state of Sinaloa, México: abstract the American Phytopathological Society. *Phytopathology*, 72:171.
- ARAÚJO JCA, Pereira JCR, Gasparotto L, Arruda MR (2006) O complexo superbrotamento do guaranazeiro e seu controle. *Comunicado Técnico*, 45. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, 4pp.
- ARAÚJO, J. C.A., Pereira, J.C.R., Gasparotto, L., Arruda, M.R. (2006). Complexo superbrotamento do guaranazeiro e seu controle. *Comunicado técnico* 45. Embrapa CPAA
- ASGHAR, M.A.; Li, Y.; Jiang, H.; Sun, X.; Ahmad, B.; Imran, S.; Yu, L.; Liu, C.; Yang, W.; Du, J. Crosstalk between Abscisic Acid and Auxin under Osmotic Stress. *Agron. J.* 2019, 111. [Google Scholar] [CrossRef]
- ATROCH A.L. (2002) Aspectos gerais da cultura do guaraná. *Journal of Japan*, 204: 53-59.
- ATROCH, A.L. 2002. Aspectos gerais da cultura do guaraná. *Foods and Food Ingredients Journal fo Japan* 204: 53-59.
- ATROCH, A.L.; Nascimento-Filho, F.J.; Angelo, P.C.S.; Freitas, D.V.; Sousa, N.R.; Resende, M.D.V.; Clement, C.R. (2009). Domesticação e Melhoramento de Guaranazeiro. In: Borém, A.; Lopes, M.T.G.; Clement, C.R. (Eds). *Domesticação e Melhoramento – Espécies Amazônicas*. Ed. Suprema Ltda – Universidade Federal de Viçosa. pp. 333 – 361

BAILEY, S., Percy, D. M., Hefer, C. A., & Cronk, Q. C. (2015). The transcriptional landscape of insect galls: psyllid (Hemiptera) gall formation in Hawaiian *Metrosideros polymorpha* (Myrtaceae). *BMC genomics*, 16(1), 943.

BASTER P, Robert S, Kleine-vehn J et al (2013) SCFTIR1/AFB auxin signalling regulates PIN vacuolar trafficking and auxin fluxes during root gravitropism', *The EMBO Journal*, 32: 260-274.

BASTOS CN, Santos AO (2001) Superbrotamento de inflorescências do Limão-de-Caiena causado por *Fusarium decemcellulare*. *Fitopatologia Brasileira*, 26, 222.

BATISTA, M. F. And Bolkan, H. A. Superbrotamento do guaranazeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 7:315-317. 1982.

BAUM, G., Chen, Y., Arazi, T., Takats Auji, H. and Fromm, H. (1993) A plant glutamate-decarboxylase containing a calmodulin binding domain: cloning, sequence, and functional analysis. *J. Biol. Chem.*, 268, 19610-19617.

BAUM, G., Lev-Yadun, S., Fridmann, Y., Arazi, T., Katsnelson, H., Zik, M., & Fromm, H. (1996). Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. *The EMBO Journal*, 15(12), 2988-2996.

BENCINA, M., Legisa, M., and Read, N.D. (2005) Cross-talk between cAMP and calcium signaling in *Aspergillus niger*. *Mol Microbiol* 56: 268–281.

BENNETT T, Hines G, Rongen M V et al (2016) 'Connective auxin transport in the shoot facilitates communication between shoot apices', *PLoS Biology*, 14: e1002446.

BITRIÁN, M., Zarza, X., Altabella, T., Tiburcio, A Alcázar, R. (2012). Polyamines under Abiotic Stress: Metabolic Crossroads and Hormonal Crosstalks in Plants. *Metabolites*. 2. 516-528. 10.3390/metabo2030516

BITRIÁN, M., Zarza, X., Altabella, T., Tiburcio, A. F., & Alcázar, R. (2012). Polyamines under abiotic stress: metabolic crossroads and hormonal crosstalks in plants *Metabolites*, V.2, n.3, 516-528.

BLAKESLEE, J. J., Spatola Rossi, T., & Kriechbaumer, V. (2019). Auxin biosynthesis: spatial regulation and adaptation to stress. *Journal of experimental botany*, 70(19), 5041-5049.

BLOKHINA, Olga, and Kurt V. Fagerstedt. "Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems." *Physiologia Plantarum* 138.4 (2010): 447-462.

BOLGER AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170.

BOUCHÉ, N.; Fromm, H. GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci.* 2004, 9, 110–115.

BOUCHÉ, Nicolas, Benoît Lacombe, and Hillel Fromm. "GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism." *Trends in cell biology* 13.12 (2003): 607-610.

BOURGAUD, Frederic, et al. "Production of plant secondary metabolites: a historical perspective." *Plant science* 161.5 (2001): 839-851.

BRAND, A., Shanks, S., Duncan, V.M.S., Yang, M., Mackenzie, K., and Gow, N.A.R. (2007) Hyphal orientation of *Candida albicans* is regulated by a calcium-dependent mechanism. *Curr Biol* 17: 347–352.

BROWN NA, Urban M, Van De Meene AML, Hammond-Kosack KE (2010) The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal Biology*, 114: 555-571.

CABRAL, D., Ballesteros, H. F., de Melo, B. P., Lourenço-Tessutti, I. T., de Siqueira, K. M. S., Obicci, L., ... & de Almeida Engler, J. (2021). The Armadillo BTB protein ABAP1 is a crucial player in DNA replication and transcription of nematode-induced galls. *Frontiers in Plant Science*, 12.

CANET, J. V., Dobón, A., & Tornero, P. (2012). Non-recognition-of-BTH4, an *Arabidopsis* mediator subunit homolog, is necessary for development and response to salicylic acid. *The Plant Cell*, 24(10), 4220-4235.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático - Material Suplementar. *Química Nova*, v. 31 (3), p. S1-S5. 2008b.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático – Nota técnica. Química Nova, v. 31 (3), p. 669-675. 2008a.

CARRARI, Fernando; FERNIE, Alisdair R.; IUSEM, Norberto D. Heard it through the grapevine? ABA and sugar *cross-talk*: the ASR story. Trends in plant science, v. 9, n. 2, p. 57-59, 2004.

CHEN Q, Liu Y, Maere S et al (2015) 'A coherent transcriptional feed-forward motif model for mediating auxin-sensitive PIN3 expression during lateral root development', Nature Communications, 6, 8821.

CHEN, J., Zheng, W., Zheng, S., Zhang, D., Sang, W., Chen, X., et al. (2008) Rac1 is required for pathogenicity and chm1-dependent conidiogenesis in rice fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. PLoS Pathog 4: e1000202.

CHEN, Y.; Shen, H.; Wang, M.; LI, Q.; HE, Z. Salicyloyl-aspartate synthesized by the acetyl-amido synthetase GH3.5 is a potential activator of plant immunity in *Arabidopsis*. Acta Biochim Biophys Sin, v. 45, p. 827-836, 2013.

CHEN, Y., Baum, G. and Fromm, H. (1994) The 58-kilodalton calmodulin binding Cona, A.; Rea, G.; Angelini, R.; Federico, R.; Tavladoraki, P. Functions of amine oxidases in plant development and defence. Trends Plant Sci. 2006, 11, 80–88.

CHIWOCHA SD, Abrams SR, Ambrose SJ et al. (2003) A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. The Plant Journal, 35, 405-417.

CHUNG KR, Shilts T, Ertürk U et al (2003) Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. FEMS Microbiology Letters, 226, 23-30.

COHEN BA, Amsellem Z, Maor R, Sharon A, Gressel J. 2002. Transgenically enhanced expression of indole-3-acetic acid confers hypervirulence to plant pathogens. Phytopathology 92: 590–596.

CONAB (2020) Guaraná - Período: 01 a 31/10/2020. [https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-](https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e)

extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-guarana/item/14477-guarana-analise-mensal-outubro-2020.

CONESA AS, Götz JM, García-Gómez J, Terol J, Talón M, Robles M (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 18: 3674-3676.

CONESA, A.; Götz, S.; García-Gómez, J.M.; Terol, J.; Talón, M.; Robles, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, v. 21, p. 3674-3676, 2005.

CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. Espectrometria de massas de proteínas: o papel-chave da espectrometria de massas na era pós-genômica. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 36, p. 40-46. 2006.

CUOMO CA, Güldener U, Xu JR, Trail F, Turgeon BG, et al. (2007) The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science* 317: 1400–1402.

DENANCÉ N, Sánchez-ValletA, Goffner D, Molina A. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Front Plant Sci* (2013) 4:155.

DOMINGUEZ, P.G., Carrari, F., 2015. ASR1 transcription factor and its role in metabolism. *Plant Signal. Behav.* 10, e992751. <https://doi.org/10.4161/15592324.2014.992751>

DOMINGUEZ, Pia Guadalupe; CARRARI, Fernando. ASR1 transcription factor and its role in metabolism. *Plant signaling & behavior*, v. 10, n. 4, p. e992751, 2015.

DUKE JA, Bogenschutz-Godwin MJ, duCellier J, Duke PAK (2002) *Handbook of Medicinal Herbs*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL: 896pp.

EHLTING, Jürgen, et al. "Three 4-coumarate: coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms." *The plant journal* 19.1 (1999): 9-20.

ENDERS, Tara A.; STRADER, Lucia C. Auxin activity: Past, present, and future. *American journal of botany*, v. 102, n. 2, p. 180-196, 2015.

FARR, D.F., & Rossman, A.Y. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved May 7, 2021, from /fungaldatabases

FARR, D.F., & Rossman, A.Y. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved September 2, 2019, from <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>.

FOYER, Christine H., and Graham Noctor. "Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria." *Physiologia plantarum* 119.3 (2003): 355-364.

FRAENKEL, Gottfried S. "The raison d'etre of secondary plant substances." *Science* (1959): 1466-1470.

FRANSEN RJ1, Frandsen M, Giese H. Targeted Gene Replacement in Fungal Pathogens via *Agrobacterium tumefaciens*- Mediated Transformation. *Plant Fungal Pathogens Methods in Molecular Biology* Volume 835, 2012, pp 17-45

FREITAS DV, Carvalho CR, Filho FJN, Astolfi-Filho S (2007) Karyotype with 210 chromosomes in guarana (*Paullinia cupana* 'Sorbilis'). *Journal of Plant Research*, 120, 399-404.

FU, X., Shi, Z., Jiang, Y., Jiang, L., Qi, M., Xu, T., & Li, T. (2019). A family of auxin conjugate hydrolases from *Solanum lycopersicum* and analysis of their roles in flower pedicel abscission. *BMC plant biology*, 19(1), 1-17.

GEE MA, Hageni G, Guilfoyle TJ (1991) 'Tissue-Specific and Organ-Specific Expression of Soybean Auxin-Responsive Transcripts GH3 and SAURs', *The Plant Cell*, 3, 419-430.

GELDNER N, Anders N, Wolters H et al (2003) The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell*, 112, 219–230.

GHEYSEN, G., & Mitchum, M. G. (2019). Phytoparasitic nematode control of plant hormone pathways. *Plant physiology*, 179(4), 1212.

GLICK, B. R., Cheng, Z., Czarny, J., & Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. In *New perspectives and approaches in plant growth-promoting Rhizobacteria research* (pp. 329-339).

GÓMEZ-Gómez, L., & Carrasco, P. (1998). Differential Expression of the S-Adenosyl-L-Methionine Synthase Genes during Pea Development. *Plant physiology*, 117(2), 397-405.

GONZALEZ, M. E., Jasso-Robles, F. I., Flores-Hernández, E., Rodríguez-Kessler, M., & Pieckenstain, F. L. (2020). Current status and perspectives on the role of polyamines in plant immunity. *Annals of Applied Biology*.

Gonzalez, M. E., Marco, F., Minguet, E. G., Carrasco-Sorli, P., Blázquez, M. A., Carbonell, J., ... Pieckenstain, F. L. (2011). Perturbation of spermine synthase gene expression and transcript profiling provide new insights on the role of the tetraamine spermine in *Arabidopsis* defense against *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiology*, 156, 2266–2277.

GONZALEZ, M. E., Marco, F., Minguet, E. G., Carrasco-Sorli, P., Blázquez, M. A., Carbonell, J., ... Pieckenstain, F. L. (2011). Perturbation of spermine synthase gene expression and transcript profiling provide new insights on the role of the tetraamine spermine in *Arabidopsis* defense against *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiology*, 156, 2266–2277

GONZÁLEZ-Lamothe R, Oirdi ME, Brisson N, Bouarab K (2012) The Conjugated Auxin Indole-3-Acetic Acid–Aspartic Acid Promotes Plant Disease Development. *The Plant Cell*, 24, 762-777.

GONZÁLEZ-lamothe, R.; Oirdi, M. E.; Brisson, N.; Bouaraba, K. The conjugated auxin indole-3-acetic acid–aspartic acid promotes plant disease development. *The Plant Cell*, v. 4, p. 762-777, 2012.

GRABHERR MG, Haas BJ, Yassour M et al. (2011) Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature Biotechnology*, 29: 644-652.

GRÄFENHAN, T. Schroers, H.-J. Nirenberg, H.I. Seifert, K.A. (2011). An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of necrotrophic fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella* *Stud. Mycol.*, 68, pp. 79–113

- GREENLAND, A. J., & Lewis, D. H. (1984). Amines in barley leaves infected by brown rust and their possible relevance to formation of 'green islands'. *New Phytologist*, 96(2), 283-291.
- GUILFOYLE T, Ulmasov T, Hagen G (1998) 'The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription', *Cellular and Molecular Life Sciences* 54, 619-627.
- GUIMARÃES ALA, Neufeld PM, Santiago-Fernandes LDR, Vieira ACM (2015) Structure and development of 'witches' broom' galls in reproductive organs of *Byrsonima sericea* (*Malpighiaceae*) and their effects on host plants. *Plant Biology*, 17, 493-504.
- GUIMARÃES, Elaine Aparecida. *Biologia reprodutiva, filogenia e patogenicidade de Fusarium decemcellulare*. Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Lavras (UFLA) 2013
- HAMERSKI L, Somner GV, Tamaio N (2013) *Paullinia cupana* Kunth (*Sapindaceae*): A review of its ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7, 2221-2229.
- HECKMAN MA, Weil J, Mejia GJ (2010) Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters. *Journal of Food Science*, 75, 77-87.
- HESKETH, A. R.; CHANDRA, G.; SHAW, A. D.; ROWLAND, J. J.; KELL, D. B.; BIBB, M. J.; CHATER, K. F. Primary and secondary metabolism, and posttranslational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, v. 46 (4), p. 917-932. 2002.
- HEWEZI, T., Howe, P. J., Maier, T. R., Hussey, R. S., Mitchum, M. G., Davis, E. L., & Baum, T. J. (2010). Arabidopsis spermidine synthase is targeted by an effector protein of the cyst nematode *Heterodera schachtii*. *Plant physiology*, 152(2), 968-984.
- Hirakawa, T., Hasegawa, J., White, C. I., & Matsunaga, S. (2017). RAD 54 forms DNA repair foci in response to DNA damage in living plant cells. *The Plant Journal*, 90(2), 372-382.

HOFHUIS H, Laskowski M, Du Y et al (2013) 'Phyllotaxis and rhizotaxis in Arabidopsis are modified by three PLETHORA transcription factors', *Current Biology*, 23, 956-962.

HUANG DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4: 44–57.

HUANG, M. et al. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytol.* 193, 997–1008 (2012).

HUSSAIN, Syed Sarfraz, et al. "Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants." *Biotechnology advances* 29.3 (2011): 300-311.

HWANG, Ildoo, Jen Sheen, and Bruno Müller. "Cytokinin signaling networks." *Annual review of plant biology* 63 (2012): 353-380.

ISHIDA T, Adachi S, Yoshimura M et al (2010) Auxin modulates the transition from the mitotic cycle to the endocycle in Arabidopsis. *Development*, 137, 63-71.

JASSO-ROBLES, F. I., Gonzalez, M. E., Pieckenstein, F. L., Ramírez-García, J. M., Guerrero-González, M. d. I. L., Jiménez-Bremont, J. F., & Rodríguez-Kessler, M. (2020). Decrease of Arabidopsis PAO activity entails increased RBOH activity, ROS content and altered response to *Pseudomonas*. *Plant Science*, 292, 110372.

JIMÉNEZ Bremont, J. F., Marina, M., Guerrero-González, M. D. L. L., Rossi, F. R., Sánchez-Rangel, D., Rodríguez-Kessler, M., & Gárriz, A. (2014). Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions. *Frontiers in Plant Science*, 5, 95.

Jing, H.; Strader, L.C. Interplay of Auxin and Cytokinin in Lateral Root Development. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 486. [Google Scholar] [CrossRef]

KARNOVSKY M.J (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 27, 137A.

KAUR, A., & Kaur, N. (2018). Mango malformation: A fungal disease, physiological disorder or malady of stress. *Journal of Applied and Natural Science*, 10(1), 403-409.

KIBA, T., Kudo, T., Kojima, M., & Sakakibara, H. (2011). Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *Journal of Experimental Botany*, 62(4), 1399-1409.

KIM D, Perteza G, Trapnell C et al (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 14:R36.

KIMURA, A., Takano, Y., Furusawa, I., & Okuno, T. (2001). Peroxisomal metabolic function is required for appressorium-mediated plant infection by *Colletotrichum lagenarium*. *The Plant Cell*, 13(8), 1945-1957.

KOO, A. J., & Howe, G. A. (2009). The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1571-1580.

KRAJAEJUN, T., Gauthier, G.M., Rappleye, C.A., Sullivan, T.D., Klein, B.S. Development and application of a green fluorescent protein sentinel system for identification of RNA interference in *Blastomyces dermatitidis* illuminates the role of septin in morphogenesis and sporulation *Eukaryot Cell*, 6 (2007), pp. 1299–1309.

KULKARNI GB, Sanjeevkumar S, Kirankumar B et al (2013) Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis in *Fusarium delphinoides* Strain GPK, a Causal Agent of Wilt in Chickpea. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 169, 1292-1305.

KULKARNI, Guruprasad B., et al. "Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Fusarium delphinoides* strain GPK, a causal agent of Wilt in Chickpea." *Applied biochemistry and biotechnology* 169.4 (2013): 1292-1305.

KUMAR, A., Taylor, M. A., Arif, S. A. M., & Davies, H. V. (1996). Potato plants expressing antisense and sense S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. *The Plant Journal*, 9(2), 147-158.

KURI CMB (2008) The Guaraná Industry in Brazil. *International Business & Economics Research Journal*, 7, 87-98.

KUZMANOVIĆ, N., Smalla, K., Gronow, S., & Puławska, J. (2018). *Rhizobium tumorigenes* sp. nov., a novel plant tumorigenic bacterium isolated from cane gall tumors on thornless blackberry. *Scientific reports*, 8(1), 9051.

- LAN, M., Li, G., Hu, J., Yang, H., Zhang, L., Xu, X., ... & Sun, R. (2019). iTRAQ-based quantitative analysis reveals proteomic changes in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) in response to *Plasmodiophora brassicae* infection. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
- LAWRENCE JS, Câmpelo AMFL, Figueiredo JM (1991) Enfermidades do cacauzeiro: II. Doenças fúngicas que ocorrem nas folhas, ramos e tronco. *Agrotropica*, 3, 1-14.
- LE Floch G, Rey P, Benizri E et al (2003) Impact of auxin-compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. *Plant and Soil*, 257, 459-470.
- LEE CW, Efetova M, Engelmann JC et al (2009) *Agrobacterium tumefaciens* promotes tumor induction by modulating pathogen defense in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 21, 2948-2962.
- LEE E, Helt GA, Reese JT, Munoz-Torres MC, Childers CP, Buels RM, Stein L, Holmes IH, Elsik CG, Lewis SE: Web Apollo: a web-based genomic annotation editing platform. *Genome Biol* 2013, 14: R93.
- LEE, M. M., Lee, S. H., & Park, K. Y. (1997). Effects of spermine on ethylene biosynthesis in cut carnation (*Dianthus caryophyllus* L) flowers during senescence. *Journal of plant physiology*, 151(1), 68-73.
- LEE, Yuree, et al. "A lignin molecular brace controls precision processing of cell walls critical for surface integrity in *Arabidopsis*." *Cell* 173.6 (2018): 1468-1480.
- Ahuja, I., Kissen, R. & Bones, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.* 17, 73 –90 (2012).
- LEGAZ, M. E., Armas, R. D., Piñón, D., & Vicente, C. (1998). Relationships between phenolics-conjugated polyamines and sensitivity of sugarcane to smut (*Ustilago scitaminea*). *Journal of Experimental Botany*, 49(327), 1723-1728.
- LESLIE JF, Summerell BA (2006) *The Fusarium laboratory manual*. Malden: Blackwell. 387 pp.
- LI J, Liu SC, Niu SB, Zhuang WY, Che YS (2009) Pyrrolidinones from the ascomycete fungus *Albonectria rigidiuscula*. *J Nat Prod* 73:2184–2187.

LI X, Yang DL, Sun L et al (2016) The Systemic Acquired Resistance Regulator OsNPR1 Attenuates Growth by Repressing Auxin Signaling through Promoting IAA-Amido Synthase Expression, *Plant Physiology*, 172, 546-558.

LI, N., Parsons, B. L., Liu, D., & Mattoo, A. K. (1992). Accumulation of wound-inducible ACC synthase transcript in tomato fruit is inhibited by salicylic acid and polyamines. *Plant molecular biology*, 18(3), 477-487.

LI, Si-Bei et al. A review of auxin response factors (ARFs) in plants. *Frontiers in plant science*, v. 7, p. 47, 2016.

LIU, F., Wu, J. B., Zhan, R. L., & Ou, X. C. (2016). Transcription Profiling Analysis of Mango–*Fusarium mangiferae* Interaction. *Frontiers in microbiology*, 7, 1443.

LIU, J.; Moore, S.; Chen, C.; Lindsey, K. Crosstalk Complexities between Auxin, Cytokinin, and Ethylene in Arabidopsis Root Development: From Experiments to Systems Modeling, and Back Again. *Mol. Plant* 2017, 10, 1480–1496.

LIU, K., Li, H., Li, W., Zhong, J., Chen, Y., Shen, C., & Yuan, C. (2017). Comparative transcriptomic analyses of normal and malformed flowers in sugar apple (*Annona squamosa* L.) to identify the differential expressed genes between normal and malformed flowers. *BMC plant biology*, 17(1), 170.

LIU, X. H., Chen, S. M., Gao, H. M., Ning, G. A., Shi, H. B., Wang, Y., ... & Lin, F. C. (2015). The small GTP ase MoYpt 7 is required for membrane fusion in autophagy and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *Environmental microbiology*, 17(11), 4495-4510.

LOBO, Igor Kelvyn Cavalcante. "Análise do transcriptoma de *Fusarium decemcellulare* agente causal do superbrotamento em guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)."

LÓPEZ-Gresa MP, Maltese F, Bellés JM, Conejero V, Kim HK, Choi YH, et al. Metabolic response of tomato leaves upon different plant–pathogen interactions. *Phytochem Anal* 2009; 21:89–94.

LUDEWIG F, Hauser A, Fromm H, Beauclair L, Bouché N: Mutants of GABA Transaminase (POP2) Suppress the Severe Phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase (ssadh) Mutants in Arabidopsis. *PLoS ONE* 2008, 3(10): e 3383.

MAJHENIC L, Skerget M, Knez Z (2007) Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104, 1258-1268.

MAOR R, Haskin S, Levi-Kedmi H, Sharon A (2004) In Planta Production of Indole-3-Acetic Acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1852-1854.

MARINA, M., Maiale, S. J., Rossi, F. R., Romero, M. F., Rivas, E. I., Gárriz, A., ... & Pieckenstein, F. L. (2008). Apoplastic polyamine oxidation plays different roles in local responses of tobacco to infection by the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and the biotrophic bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiology*, 147(4), 2164-2178.

MATOS KS, Almeida LB, Hanada RE et al (2016) Inflorescence oversprouting and vascular and rachis necrosis caused by *Fusarium decemcellulare* in *Anacardium occidentale* in Brazil. *Plant Disease*, 100, 1781.

MATSUDA F, Miyazawa H, Wakasa K, Miyagawa H (2005) Quantification of indole-3-acetic acid and amino acid conjugates in rice by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69, 778-783.

MATTOO, A.K.; Suttle, J.C. *The Plant Hormone Ethylene*; CRC Press: Boca Raton: FL, USA, 1991;21-42.

MEDEIROS, R.B.D; Velloso, M.A.S; Dianese, J.C, *Mecanismo de defesa nas interações planta-patógeno*. 1ª ed. – Brasília: editora Universidade de Brasília, 2003.

MEDENTSEV, A. G. and Akimenko, V. K., (1992) Mechanism of phytotoxic action of naphthoquinone pigments of the fungus *Fusarium decemcellulare* *Phytochemistry*, 31, p. 77.

MEDENTSEV, A.G., A.Y. Arinbasarova and V.K. Akimenko, 2002. Respiratory Activity and Naphthoquinone Synthesis in the Fungus *Fusarium decemcellulare* Exposed to Oxidative Stress. *Microbiology*, 71(2): 148-153.

MEDENTSEV, A.G., Arinbasarova, A. Iu, and Akimenko, V.K. (2005) Biosynthesis of naphthoquinone pigments by fungi of the genus *Fusarium*. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 41: 573–577.

MIALOUNDAMA, A. S. et al. Abscisic acid negatively regulates elicitor-induced synthesis of capsidiol in wild tobacco. *Plant Physiol.* 150, 1556–1566 (2009).

MIHLAN M, Homann V, Liu T-D, Tudzynski B (2003) AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR. *Mol Microbiol* 47: 975–991.

MIRABELLA R, Rauwerda H, Struys EA, Jakobs C, Triantaphylides C, Haring MA, Schuurink RC: The *Arabidopsis* *her1* mutant implicates GABA in E-2-hexenal responsiveness. *The Plant Journal* 2008, 53(2):197-213.

MIZUNO, D., Higuchi, K., Sakamoto, T., Nakanishi, H., Mori, S., & Nishizawa, N. K. (2003). Three nicotianamine synthase genes isolated from maize are differentially regulated by iron nutritional status. *Plant Physiology*, 132(4), 1989-1997.

MOCKAITIS, Keithanne, and Mark Estelle. "Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm." *Annual review of cell and developmental biology* 24 (2008).

MOFFATT, B. A., & Weretilnyk, E. A. (2001). Sustaining S-adenosyl-l-methionine-dependent methyltransferase activity in plant cells. *Physiologia Plantarum*, 113(4), 435-442.

MOFFATT, Barbara A., and Elizabeth A. Weretilnyk. "Sustaining S-adenosyl-l-methionine-dependent methyltransferase activity in plant cells." *Physiologia Plantarum* 113.4 (2001): 435-442.

Morales, J., Kadota, Y., Zipfel, C., Molina, A., & Torres, M.-A. (2016). The *Arabidopsis* NADPH oxidases RbohD and RbohF display differential expression patterns and contributions during plant immunity. *Journal of Experimental Botany*, 67, 1663–1676.

MORALES, J., Kadota, Y., Zipfel, C., Molina, A., & Torres, M.-A. (2016). The *Arabidopsis* NADPH oxidases RbohD and RbohF display differential expression patterns and contributions during plant immunity. *Journal of Experimental Botany*, 67, 1663–1676.

MORANTE-Carriel J, Sellés-Marchart S, Martínez-Márquez A et al (2014) RNA isolation from loquat and other recalcitrant woody plants with high quality and yield. *Analytical Biochemistry*, 452: 46-53.

MOSCHOU, P.N.; Paschalidis, K.A.; Roubelakis-Angelakis, K.A. Plant polyamine catabolism: The state of the art. *Plant Signal. Behav.* 2008, 3, 1061–1066.

NASCIMENTO Filho FJ, Atroch AL (2002) Guaranazeiro. In: Brukner CH. *Melhoramento de fruteiras tropicais*. Viçosa: UFV, MG, pp 291-307.

NASER, V., & Shani, E. (2016). Auxin response under osmotic stress. *Plant molecular biology*, 91(6), 661-672.

NELSON, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6ª ed. – Porto Alegre: Artmed, 2014. 1298 p

NGUYEN, Q. B., Kadotani, N., Kasahara, S., Tosa, Y., Mayama, S., & Nakayashiki, H. (2008). Systematic functional analysis of calcium-signalling proteins in the genome of the rice-blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a high-throughput RNA-silencing system. *Molecular microbiology*, 68(6), 1348-1365.

NIEHAUS, E. M., Münsterkötter, M., Proctor, R. H., Brown, D. W., Sharon, A., Idan, Y. & Tarkowská, D. (2016). Comparative “omics” of the *Fusarium fujikuroi* species complex highlights differences in genetic potential and metabolite synthesis. *Genome biology and evolution*, 8(11), 3574-3599.

O'BRIEN TP, Feder N, Mccully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma*, 59, 368-373.

O'DONNELL K, Rooney AP, Proctor RH, Brown DW, McCormick SP, et al. 2013. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genet. Biol.* 52:20–31

O'DONNELL K, Sutton DA, Rinaldi MG et al (2010) Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 3708-3718.

O'DONNELL K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence

from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 2044-2049.

OMOARELOJIE, L.O.; Kulkarni, M.G.; Finnie, J.F.; Van Staden, J. Strigolactones and their crosstalk with other phytohormones. *Ann. Bot.* 2019, 124, 749–767. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

PACIOREK T, Zazímalova´ E, Ruthardt N et al. (2005) Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature*, 435, 1251–1256.

PALANIVELU, R., Brass, L., Edlund, A. F., & Preuss, D. (2003). Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels. *Cell*, 114(1), 47-59.

PALNI, L. M. S., Burch, L., & Horgan, R. (1988). The effect of auxin concentration on cytokinin stability and metabolism. *Planta*, 174(2), 231-234.

PANDEY, S., Ranade, S. A., Nagar, P. K., & Kumar, N. (2000). Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *Journal of biosciences*, 25 (3), 291-299.

PERROT-Rechenmann C (2010) Cellular Responses to Auxin: Division versus Expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, a001446.

PETRÁSEK J, Elckner M, Morris DA, Zazímalova E (2002) Auxin efflux carrier activity and auxin accumulation regulate cell division and polarity in tobacco cells, *Planta*, 216, 302-308.

PETTI,C.,Reiber,K.,Ali,S.S.,Berney,M., and Doohan,F.M.(2012). Auxinas a player in the biocontrol of Fusarium head blight disease of barley and its potential as a disease control agent. *BMC PlantBiol.* 12:224.

PLOETZ R, Vazquez A, Benscher D (1996) First report of Fusarium decemcellulare as a pathogen of mango in the United States. *Plant Disease*, 80, 1207.

POWERS, Samantha K.; STRADER, Lucia C. Regulation of auxin transcriptional responses. *Developmental Dynamics*, v. 249, n. 4, p. 483-495, 2020.

QIAN, L., Wenyu, Y., Xiaoping, Y., Songlin, R., Haifeng, C., Huasheng, M., & Zihong, Y. (2011). A preliminary study on proteome variations associated with

gall formation in *Zizania latifolia* Trucs. *Plant molecular biology reporter*, 29(2), 360-368.

QUAN Y, Minocha R, Minocha SC. (2002) Genetic manipulation of polyamine metabolism in poplar. II. Effects on ethylene biosynthesis. *Plant Physiol Biochem.* 40, 929-937.

RAKUSOVÁ H, Abbas M, Han H et al (2016) Termination of Shoot Gravitropic Responses by Auxin Feedback on PIN3 Polarity, *Current Biology*, 26, 3026–3032.

RENAULT, H., Roussel, V., El Amrani, A., Arzel, M., Renault, D., Bouchereau, A., & Deleu, C. (2010). The *Arabidopsis* pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. *BMC Plant Biology*, 10(1), 20.

ROBERTS, M. R. (2007). Does GABA Act as a Signal in Plants? Hints from Molecular Studies: Hints from Molecular Studies. *Plant signaling & behavior*, 2(5), 408-409.

ROOSJEN, Mark; PAQUE, Sébastien; WEIJERS, Dolf. Auxin response factors: output control in auxin biology. *Journal of experimental botany*, v. 69, n. 2, p. 179-188, 2018.

SASS, John Eugene et al. *Botanical microtechnique*. *Botanical microtechnique.*, n. 3rd ed, 1958.

SCHIMPL F, Silva J, Goncalves J, Mazzafera P (2013) Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 150, 14-31.

SHELP BJ, Bown AW, McLean MD: Metabolism and functions of gammaaminobutyric acid. *Trends in Plant Science* 1999, 4(11):446-452.

SHEN, B., Li, C., & Tarczynski, M. C. (2002). High free-methionine and decreased lignin content result from a mutation in the *Arabidopsis* S-adenosyl-L-methionine synthetase 3 gene. *The Plant Journal*, 29(3), 371-380.

SIMONINI S, Benciveng S, Trick M, Østergaard L (2017) Auxininduced modulation of ETTIN activity orchestrates gene expression in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 29, 1864-1882.

SIRIPUTTHAIWAN, P., Jauneau, A., Herbert, C., Garcin, D., & Dumas, B. (2005). Functional analysis of CLPT1, a Rab/GTPase required for protein secretion and pathogenesis in the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of cell science*, 118(2), 323-329.

SNEDDEN, W.A., Koutsia, N., Baum, G. and Fromm, H. (1996) Activation of a recombinant petunia glutamate decarboxylase by calcium/calmodulin or by a monoclonal antibody which recognizes the calmodulin-binding domain. *J. Bio. Chem.*, 271, 4148-4153.

SOUZA, A. L., Angelo, P. C. S., Nogueira, P. P. O., Gonçalves, J. F. C., Franco, A. M., Astolfi-Filho, S., ... & Andrade, E. V. (2014). Method for obtaining high-resolution proteomic analysis from pericarps of guarana. *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 8014-8024.

SOUZA, A. L., Angelo, P. C. S., Nogueira, P. P. O., Gonçalves, J. F. C., Franco, A. M., Astolfi-Filho, S., ... & Andrade, E. V. (2014). Method for obtaining high-resolution proteomic analysis from pericarps of guarana. *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 8014-8024.

STEINBACH, W.J., Cramer, R.A., Zachary Perfect, B., Jr, Asfaw, Y.G., Sauer, T.C., Najvar, L.K., et al. (2006) Calcineurin controls growth, morphology and pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* 5: 1091–1103.

SUMMERELL BA, Salleh B, Leslie JF (2003) A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease*, 87, 117-128.

SUZUKI, H., Yokokura, J., Ito, T., Arai, R., Yokoyama, C., Toshima, H., ... & Suzuki, Y. (2014). Biosynthetic pathway of the phytohormone auxin in insects and screening of its inhibitors. *Insect biochemistry and molecular biology*, 53, 66-72.

Tai, L., Li, B. B., Nie, X. M., Zhang, P. P., Hu, C. H., Zhang, L., ... & Chen, K. M. (2019). Calmodulin is the fundamental regulator of NADK-mediated NAD signaling in plants. *Frontiers in plant science*, 10, 681.

TAIZ, L.; Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*. 5ª ed. – Porto Alegre: Artmed, 2013.

TAKASE T, Nakazawa M, Ishikawa A et al. (2004) ydk1-D, an auxin-responsive GH3 mutant that is involved in hypocotyl and root elongation. *The Plant Journal*, 37, 471-483.

TANIGUCHI, Shiduku et al. Isolation of jasmonate-induced sesquiterpene synthase of rice: product of which has an antifungal activity against *Magnaporthe oryzae*. *Journal of plant physiology*, v. 171, n. 8, p. 625-632, 2014.

TEALE, William D.; PAPONOV, Ivan A.; PALME, Klaus. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 7, n. 11, p. 847-859, 2006.

TEIXEIRA PJ, Thomazella DP, Reis O et al (2014) High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *The Plant Cell*, 26, 4245-4269.

TEIXEIRA, P. J. P. L., de Toledo Thomazella, D. P., Reis, O., do Prado, P. F. V., do Rio, M. C. S., Fiorin, G. L., ... & Mieczkowski, P. (2014). High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *The Plant Cell*, 26(11), 4245-4269.

TEO ZWN, Song S, Wang Y et al (2014) New insights into the regulation of inflorescence architecture. *Trends in Plant Science*, 19, 158-165.

TRAPNELL C, Williams BA, Perteau G et al (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28: 511-515.

TSAVKELOVA E, Oeser B, Oren-Young L et al (2012) Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology*, 49, 48-57.

TSAVKELOVA, E., Oeser, B., Oren-Young, L., Israeli, M., Sasson, Y., Tudzynski, B., & Sharon, A. (2012). Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology*, 49(1), 48-57.

TSAVKELOVA, Elena et al. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology*, v. 49, n. 1, p. 48-57, 2012.

TURECKOVÁ V, Novák O, Strnad M (2009) Profiling ABA metabolites in *Nicotiana tabacum* L. leaves by ultra-performance liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*, 80, 390-399.

VICENTE LP, de la Parte EM, Pérez TC (2012) First report in Cuba of Green Point Gall of Cocoa Cushion caused by *Albonectria rigidiuscula* (*Fusarium decemcellulare*). *Fitosanidad*, 16, 19-25.

VILAS, J. M., Romero, F. M., Rossi, F. R., Marina, M., Maiale, S. J., Calzadilla, P. I., ... & Gárriz, A. (2018). Modulation of plant and bacterial polyamine metabolism during the compatible interaction between tomato and *Pseudomonas syringae*. *Journal of plant physiology*, 231, 281-290.

VRABKA, J., Niehaus, E., Münsterkötter, M., Proctor, R. H., Brown, D. W., Novák, O., ... & Bergougnoux, V. (2018). Production and role of hormones during interaction of *Fusarium* species with maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Frontiers in plant science*, 9, 1936.

WALTERS, Dale R. "Polyamines and plant disease." *Phytochemistry* 64.1 (2003): 97-107.

WEIJERS, D.; Wagner, D. Transcriptional Responses to the Auxin Hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2016, 67, 539–574. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

WEISS, D.; Ori, N. Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones. *Plant Physiol.* 2007, 144, 1240–1246. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

WIEMANN P, Sieber CMK, von Bargen KW, Studt L, Niehaus E-M, et al. 2013. Deciphering the cryptic genome: Genome-wide analyses of the rice pathogen *Fusarium fujikuroi* reveal complex regulation of secondary metabolism and novel metabolites. *PLoS Pathog.* 9:e1003475.

WIEMANN, P Tudzynski, B. (2013) The nitrogen regulation network and its impact on secondary metabolism and pathogenicity. In: Brown DW & Proctor R H (Eds), *Fusarium: Genomics, Molecular and Cellular Biology*. Norwich, UK: Caister Academic Press.

XING, S. G., Jun, Y. B., Hau, Z. W., & Liang, L. Y. (2007). Higher accumulation of γ -aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(8), 560-566.

XING, S.G.; Jun, Y.B.; Hau, Z.W.; Liang, L.Y. Higher accumulation of γ -aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots. *Plant Physiol. Biochem.* 2007, 45, 560–566.

YATES, J.R. Mass Spectrometry and the Age of the Proteome. *Journal of Mass Spectrometry*, 33: 1-19. 1998.

YI, M., Chi, M. H., Khang, C. H., Park, S. Y., Kang, S., Valent, B., & Lee, Y. H. (2009). The ER chaperone LHS1 is involved in asexual development and rice infection by the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell*, 21(2), 681-695.

YIN C, Park JJ, Gang DR, Hulbert SH (2014) Characterization of a Tryptophan 2-Monooxygenase Gene from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* involved in auxin biosynthesis and rust pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 27, 227-235.

YIN, Tan Tzy, Ui Li Pin, and Amir Hamzah Ahmad Ghazali. "Influence of External Nitrogen on Nitrogenase Enzyme Activity and Auxin Production in *Herbaspirillum seropedicae* (Z78)." *Tropical Life Sciences Research* 26.1 (2015): 101.

YOON, S., Lee, W., Kim, M., Kim, T. D., & Ryu, Y. (2012). Structural and functional characterization of S-adenosylmethionine (SAM) synthetase from *Pichia ciferrii*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(1-2), 173-181.

ZEMOVÁ R, Zwiewka M, Bielach A et al (2016) A Forward Genetic Screen for New Regulators of Auxin-mediated Degradation of Auxin Transport Proteins in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Plant Growth Regulation* 35, 465-476.

ZHANG, H.; Chen, J.; Zhang, F.; Song, Y. Transcriptome analysis of callus from melon. *Gene*, 2018.

ZHAO, Jian, Lawrence C. Davis, and Robert Verpoorte. "Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites." *Biotechnology advances* 23.4 (2005): 283-333.

ZHAO, Yunde. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual review of plant biology*, v. 61, p. 49-64, 2010.

ZHENG, H., Miao, P., Lin, X., Li, L., Wu, C., Chen, X., ... & Zheng, W. (2018). Small GTPase Rab7-mediated FgAtg9 trafficking is essential for autophagy-dependent development and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *PLoS genetics*, 14(7), e1007546.

ZHENG, W., Chen, J., Liu, W., Zheng, S., Zhou, J., Lu, G., et al. (2007) A Rho3 homolog is essential for appressorium development and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Eukaryot Cell* 6: 2240–2250.

ZHENG, W., Zhao, Z., Chen, J., Liu, W., Ke, H., Zhou, J., et al. (2009) A Cdc42 ortholog is required for penetration and virulence of *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genet Biol* 46:450–460.

Apêndice A

Genes diferencialmente expressos envolvidos no processo metabólico de hormônios vegetais

Anotação	transcript_id	gene_id	locus	Amostra_1	Amostra_2	value_1	value_2	log2(fold_change)	test_stat	p_value	q_value	Significativo
AUXINA												
<i>auxin response factor 19(ARF19)</i>	XLOC_002917	XLOC_002917	TRINITY_DN101811_c0_g9_i1:0-276	Sintomático	Assintomático	45.9732	0	-inf	-nan	5.00E-05	0.00478824	sim
<i>RING-box 1(RBX1)</i>	XLOC_008460	XLOC_008460	TRINITY_DN104337_c0_g7_i1:1-234	Sintomático	Assintomático	73.12	0	-inf	-nan	0.00015	0.0107296	sim
<i>Probable glutathione S-transferase(HSP26-A)</i>	XLOC_014184	XLOC_014184	TRINITY_DN106281_c1_g3_i1:0-230	Sintomático	Assintomático	44.7332	0	-inf	-nan	0.00105	0.0357445	sim
<i>RUB1 conjugating enzyme 1(RCE1)</i>	XLOC_023589	XLOC_023589	TRINITY_DN108628_c4_g16_i1:4-215	Sintomático	Assintomático	0	89.4947	inf	-nan	0.0007	0.0276245	sim
<i>Probable glutathione S-transferase(HSP26-A)</i>	XLOC_033356	XLOC_033356	TRINITY_DN110482_c2_g13_i1:0-403	Sintomático	Assintomático	450.7	20.3915	-4.46613	-5.1824	0.0009	0.0322965	
<i>probable glutathione S-transferase parC(LOC107823949)</i>	XLOC_034837	XLOC_034837	TRINITY_DN110748_c5_g14_i1:0-336	Sintomático	Assintomático	96.7471	965.176	3.3185	5.9257	0.0008	0.0298404	sim
<i>probable glutathione S-transferase(LOC107782951)</i>	XLOC_034838	XLOC_034838	TRINITY_DN110748_c5_g14_i2:0-699	Sintomático	Assintomático	79.2203	1827.78	4.52808	4.05764	5.00E-05	0.00478824	sim
<i>F-box/RNI-like superfamily protein(SKP2A)</i>	XLOC_046203	XLOC_046203	TRINITY_DN112649_c3_g16_i1:0-380	Sintomático	Assintomático	19.06	0	-inf	-nan	0.00045	0.0214433	sim
<i>P-glycoprotein 3(ABC3)</i>	XLOC_061382	XLOC_061382	TRINITY_DN114797_c0_g4_i2:0-406	Sintomático	Assintomático	25.1905	0	-inf	-nan	5.00E-05	0.00478824	sim
<i>PIN-LIKES</i>	XLOC_103048	XLOC_103048	TRINITY_DN119581_c0_g9_i1:0-364	Sintomático	Assintomático	0	7.93414	inf	-nan	0.0017	0.0487275	sim
<i>GH3.3</i>	XLOC_104795	XLOC_104795	TRINITY_DN119767_c2_g13_i1:0-348	Sintomático	Assintomático	39.5384	0	-inf	-nan	5.00E-05	0.00478824	sim

<i>Auxin-binding protein ABP19a (blast2GO)</i>	XLOC_144162	XLOC_144162	TRINITY_DN123312_c12_g16_i1:0-366	Sintomático	Assintomático	20.9333	0	-inf	-nan	0.0006	0.0251441	sim
<i>Transcriptional factor B3 family protein / auxin-responsive factor AUX/IAA-like protein(NPH4) (Arf7 - blastGO)</i>	XLOC_145797	XLOC_145797	TRINITY_DN123434_c5_g32_i1:0-222	Sintomático	Assintomático	43.9435	0	-inf	-nan	0.00155	0.0458273	sim
<i>Transcriptional factor B3 family protein / auxin-responsive factor AUX/IAA-like protein(NPH4) (Arf7 - blast2GO)</i>	XLOC_145799	XLOC_145799	TRINITY_DN123434_c5_g34_i1:2-258	Sintomático	Assintomático	33.5674	0	-inf	-nan	0.0005	0.0228684	sim
<i>P-glycoprotein 5(ABCB5)</i>	XLOC_178097	XLOC_178097	TRINITY_DN85719_c0_g1_i1:0-239	Sintomático	Assintomático	49.1078	0	-inf	-nan	0.00025	0.0152168	sim
<i>P-glycoprotein 21(ABCB21)</i>	XLOC_178099	XLOC_178099	TRINITY_DN85719_c0_g3_i1:0-241	Sintomático	Assintomático	24.1592	0	-inf	-nan	0.0012	0.0390226	sim
<i>BRI1-like 2(BRL2)</i>	XLOC_178878	XLOC_178878	TRINITY_DN87195_c0_g2_i1:0-356	Sintomático	Assintomático	16.6083	0	-inf	-nan	0.00015	0.0107296	sim

CITOCININA

<i>binding partner of acd11 1(BPA1)</i>	XLOC_014340	XLOC_014340	TRINITY_DN106330_c1_g1_i1:6-1057	Sintomático	Assintomático	15.8557	0	-inf	-nan	5.00E-05	0.00478824	sim
<i>cruciferin 3(CRU3)</i>	XLOC_019659	XLOC_019659	TRINITY_DN107757_c2_g3_i1:0-402	Sintomático	Assintomático	384.214	18.4231	-4.38232	4.82957	0.0017	0.0487275	
<i>cytokinin oxidase 3(CKX3)</i>	XLOC_042658	XLOC_042658	TRINITY_DN112061_c1_g1_i1:0-1496	Sintomático	Assintomático	171.722	4.14826	-5.37143	4.01626	5.00E-05	0.004788	
<i>cytokinin oxidase 3(CKX3) probable LL-diaminopimelate aminotransferase, chloroplastic(LOC4332563)</i>	XLOC_042659	XLOC_042659	TRINITY_DN112061_c1_g2_i1:528-917	Sintomático	Assintomático	16.4787	0	-inf	-nan	5.00E-05	0.00478824	sim
	XLOC_054971	XLOC_054971	TRINITY_DN113930_c0_g8_i2:30-539	Sintomático	Assintomático	6.19034	0	-inf	-nan	0.0005	0.0228684	sim
<i>rotamase FKBP 1(ROF1)</i>	XLOC_074384	XLOC_074384	TRINITY_DN116442_c1_g24_i1:0-322	Sintomático	Assintomático	30.9439	0	-inf	-nan	5.00E-05	0.00478824	sim

<i>cytokinin oxidase/dehydrogenase 1(CKX1)</i>	XLOC_119927	XLOC_119927	TRINITY_DN121270_c0_g34_i1:5-315	Sintomático	Assintomático	16.1074	0	-inf	-nan	0.00055	0.0241175	sim
<i>cytokinin oxidase/dehydrogenase 1(CKX1)</i>	XLOC_119930	XLOC_119930	TRINITY_DN121270_c0_g3_i1:21-262	Sintomático	Assintomático	49.1329	0	-inf	-nan	0.0003	0.0167974	sim
<i>cytokinin oxidase/dehydrogenase 1(CKX1)</i>	XLOC_119934	XLOC_119934	TRINITY_DN121270_c0_g44_i1:4-463	Sintomático	Assintomático	6.81	0	-inf	-nan	0.0009	0.0322965	sim
<i>cytokinin oxidase/dehydrogenase 1(CKX1)</i>	XLOC_119941	XLOC_119941	TRINITY_DN121270_c0_g9_i1:159-463	Sintomático	Assintomático	27.3937	0	-inf	-nan	5.00E-05	0.00478824	sim

ÁCIDO ABSCÍSICO

<i>mediator of aba-regulated dormancy protein (DUF581)(AT3G63210)</i>	XLOC_014718	XLOC_014718	TRINITY_DN106452_c0_g4_i1:1-275	Sintomático	Assintomático	22.6249	0	-inf	-nan	0.0013	0.0408691	sim
<i>cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 29(CRK29)</i>	XLOC_025832	XLOC_025832	TRINITY_DN109055_c1_g15_i1:0-448	Sintomático	Assintomático	0	7.60547	inf	-nan	0.001	0.0346663	sim
<i>abscisic stress-ripening protein 1(ASR1)</i>	XLOC_028777	XLOC_028777	TRINITY_DN109657_c0_g21_i1:1-226	Sintomático	Assintomático	49.1302	0	-inf	-nan	0.00075	0.028572	sim
<i>peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 3(PKT3)</i>	XLOC_037125	XLOC_037125	TRINITY_DN111134_c0_g12_i1:358-691	Sintomático	Assintomático	17.5991	0	-inf	-nan	0.00015	0.0107296	sim
<i>nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3(NCED3)</i>	XLOC_043877	XLOC_043877	TRINITY_DN112266_c0_g9_i1:30-483	Sintomático	Assintomático	7.36457	0	-inf	-nan	0.0006	0.0251441	sim
<i>abscisic acid responsive elements-binding factor 3(ABF3)</i>	XLOC_076754	XLOC_076754	TRINITY_DN116723_c2_g31_i1:0-220	Sintomático	Assintomático	213.776	0	-inf	-nan	5.00E-05	0.00478824	sim
<i>ABI five binding protein 2(AFP2)</i>	XLOC_104505	XLOC_104505	TRINITY_DN119732_c1_g9_i1:7-440	Sintomático	Assintomático	8.8621	0	-inf	-nan	0.0002	0.0130306	sim
<i>mediator of aba-regulated dormancy protein (DUF581)(AT3G63210)</i>	XLOC_125781	XLOC_125781	TRINITY_DN121784_c5_g12_i1:2-346	Sintomático	Assintomático	16.253	0	-inf	-nan	0.0015	0.0448751	sim
<i>CAP160 protein(LTI65)</i>	XLOC_137720	XLOC_137720	TRINITY_DN122807_c4_g14_i1:2-212	Sintomático	Assintomático	125.96	0	-inf	-nan	0.0002	0.0130306	sim

<i>PATATIN-like protein 4(PLP4) naphthalene 1,2-dioxygenase subunit alpha (DUF1264)(AT1G05510) (blast2go - Oil body-associated protein 1A)</i>	XLOC_140620	XLOC_140620	TRINITY_DN123038_c4_g24_i1:1-478	Sintomático	Assintomático	21.6028	0	-inf	-nan	5.00E-05	0.00478824	sim
<i>extra-large G-protein 1(XLG1)</i>	XLOC_174516	XLOC_174516	TRINITY_DN77264_c0_g1_i1:0-797	Sintomático	Assintomático	7.90587	0	-inf	-nan	0.0001	0.00820753	sim
	XLOC_181646	XLOC_181646	TRINITY_DN91900_c1_g2_i1:0-428	Sintomático	Assintomático	10.6182	0	-inf	-nan	0.0003	0.0167974	sim

GIBERELINA

<i>myb domain protein 21(MYB21)</i>	XLOC_006209	XLOC_006209	TRINITY_DN103380_c0_g1_i1:1-423	Sintomático	Assintomático	0	10.7002	inf	-nan	0.0012	0.0390226	sim
<i>myb domain protein 21(MYB21)</i>	XLOC_006211	XLOC_006211	TRINITY_DN103380_c0_g2_i2:0-423	Sintomático	Assintomático	0	30.7663	inf	-nan	5.00E-05	0.00478824	sim
<i>myb domain protein 21(MYB21)</i>	XLOC_006212	XLOC_006212	TRINITY_DN103380_c0_g4_i1:0-423	Sintomático	Assintomático	0	19.1022	inf	-nan	0.0003	0.0167974	sim
<i>myb domain protein 21(MYB21)</i>	XLOC_006213	XLOC_006213	TRINITY_DN103380_c0_g5_i1:1-423	Sintomático	Assintomático	0	16.1352	inf	-nan	0.00045	0.0214433	sim
<i>NTM1-like 8(NTL8) xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 24(XTH24) xyloglucan</i>	XLOC_016467	XLOC_016467	TRINITY_DN106961_c3_g1_i4:4-651	Sintomático	Assintomático	5.81026	0	-inf	-nan	0.00105	0.0357445	sim
<i>endotransglucosylase/hydrolase 24(XTH24) xyloglucan</i>	XLOC_019826	XLOC_019826	TRINITY_DN107792_c3_g21_i1:83-417	Sintomático	Assintomático	18.9458	0	-inf	-nan	0.00015	0.0107296	sim
<i>endotransglucosylase/hydrolase 24(XTH24)</i>	XLOC_019829	XLOC_019829	TRINITY_DN107792_c3_g26_i1:83-417	Sintomático	Assintomático	13.3772	0	-inf	-nan	0.00055	0.0241175	sim
<i>RING/U-box superfamily protein(XERICO) Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein(HY5)</i>	XLOC_040264	XLOC_040264	TRINITY_DN111665_c1_g27_i1:3-218	Sintomático	Assintomático	102.169	0	-inf	-nan	0.00025	0.0152168	sim
	XLOC_040412	XLOC_040412	TRINITY_DN111688_c6_g5_i1:0-229	Sintomático	Assintomático	0	82.859	inf	-nan	0.0002	0.0130306	sim
<i>Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein(ATARCA)</i>	XLOC_043903	XLOC_043903	TRINITY_DN112272_c1_g6_i1:0-313	Sintomático	Assintomático	34.273	0	-inf	-nan	0.00035	0.0185702	sim

<i>snakin-2-like(LOC102582131)</i>	XLOC_115874	XLOC_115874	TRINITY_DN120879_c2_g17_i1:1-276	Sintomático	Assintomático	117.81	0	-inf	-nan	5.00E-05	0.00478824	sim
ÁCIDO SALICÍLICO												
<i>basic pathogenesis-related protein 1(PRB1)</i>	XLOC_056799	XLOC_056799	TRINITY_DN114183_c1_g11_i1:0-305	Sintomático	Assintomático	0	31.3638	inf	-nan	0.0004	0.0200799	sim
<i>basic pathogenesis-related protein 1(PRB1)</i>	XLOC_056801	XLOC_056801	TRINITY_DN114183_c1_g3_i1:0-374	Sintomático	Assintomático	0	31.0008	inf	-nan	5.00E-05	0.00478824	sim
<i>NDR1/HIN1-like 3(NHL3)</i>	XLOC_087783	XLOC_087783	TRINITY_DN117979_c2_g2_i1:0-361	Sintomático	Assintomático	12.0055	0	-inf	-nan	0.0016	0.0466831	sim
<i>methyl esterase 7(MES7) mediator of RNA polymerase II transcription subunit 15a-like protein(NRB4)</i>	XLOC_106385	XLOC_106385	TRINITY_DN119952_c2_g2_i1:3-419	Sintomático	Assintomático	11.8657	0	-inf	-nan	0.00035	0.0185702	sim
	XLOC_122491	XLOC_122491	TRINITY_DN121502_c0_g34_i1:3-240	Sintomático	Assintomático	0	50.1875	inf	-nan	0.0007	0.0276245	sim
ETILENO												
<i>basic pathogenesis-related protein 1(PRB1)</i>	XLOC_056799	XLOC_056799	TRINITY_DN114183_c1_g11_i1:0-305	Sintomático	Assintomático	0	31.3638	inf	-nan	0.0004	0.0200799	sim
<i>basic pathogenesis-related protein 1(PRB1)</i>	XLOC_056801	XLOC_056801	TRINITY_DN114183_c1_g3_i1:0-374	Sintomático	Assintomático	0	31.0008	inf	-nan	5.00E-05	0.00478824	sim
<i>Signal transduction histidine kinase, hybrid-type, ethylene sensor(EIN4)</i>	XLOC_109423	XLOC_109423	TRINITY_DN120229_c0_g26_i2:0-686	Sintomático	Assintomático	21.3144	0	-inf	-nan	5.00E-05	0.00478824	sim
<i>basic chitinase(HCHIB)</i>	XLOC_123119	XLOC_123119	TRINITY_DN12155_c0_g1_i1:0-376	Sintomático	Assintomático	182.678	0	-inf	-nan	5.00E-05	0.00478824	sim
<i>ethylene responsive element binding factor 5(ERF5) Integrase-type DNA-binding superfamily protein(AT5G43410) - Ethylene-responsive</i>	XLOC_179000	XLOC_179000	TRINITY_DN87429_c1_g1_i1:7-1227	Sintomático	Assintomático	8.32672	88.9035	3.41642	2.69218	0.00095	0.0334927	sim
	XLOC_181524	XLOC_181524	TRINITY_DN91718_c0_g1_i1:0-775	Sintomático	Assintomático	6.13905	0	-inf	-nan	0.0002	0.0130306	sim

transcription factor ERF096
(blast2go)

ÁCIDO JASMÔNICO

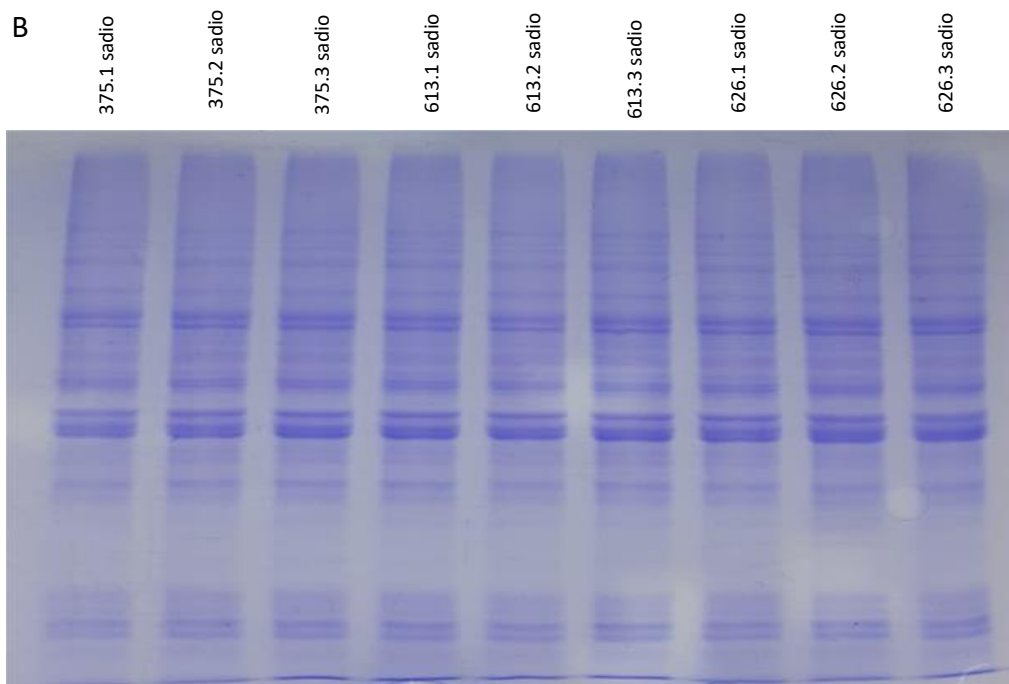
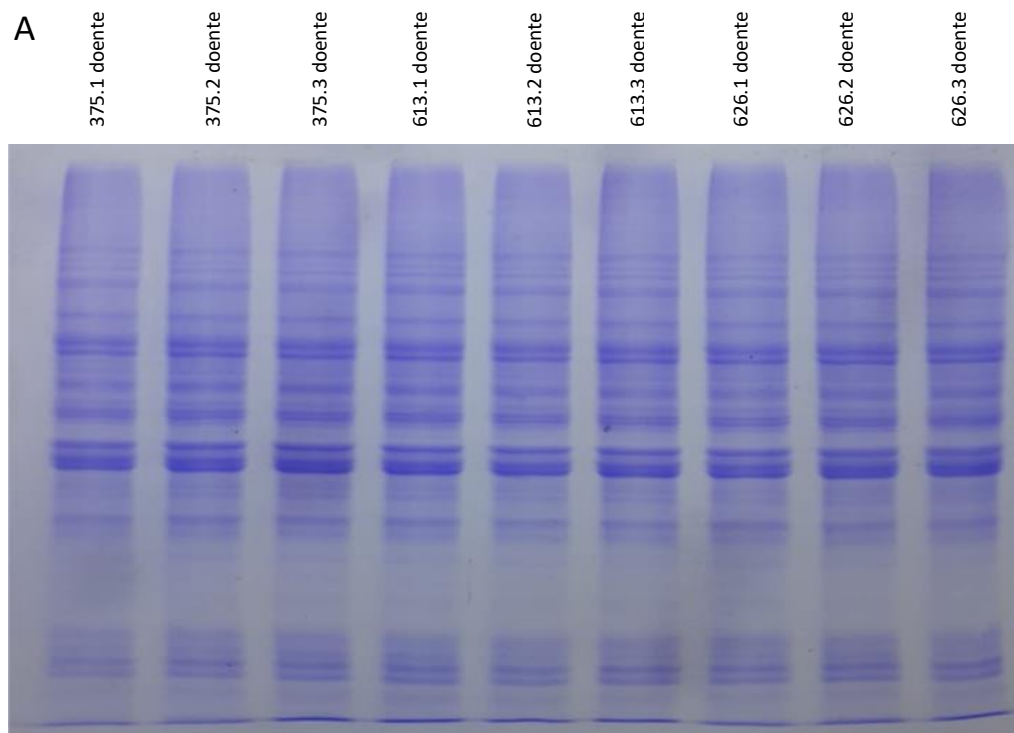
<i>subtilase 4.12(SBT4.12)</i>	XLOC_079900	XLOC_079900	TRINITY_DN117085_ c1_g18_i1:0-203	Sintomático	Assintomático	131.719	0	-inf	-nan	0.00125	0.0396853	sim
<i>Putative interactor of JAZ(NINJA)</i>	XLOC_094478	XLOC_094478	TRINITY_DN118700_ c4_g8_i1:0-205	Sintomático	Assintomático	68.0269	0	-inf	-nan	0.00125	0.0396853	sim
<i>GDP-L-galactose phosphorylase VITAMIN C DEFECTIVE 5 (VTC5)(VTC5)</i>	XLOC_113170	XLOC_113170	TRINITY_DN120629_ c8_g17_i1:1-207	Sintomático	Assintomático	93.3394	0	-inf	-nan	0.0017	0.0487275	sim
<i>terpene synthase 04(TPS04)</i>	XLOC_137596	XLOC_137596	TRINITY_DN122799_ c0_g12_i1:3-363	Sintomático	Assintomático	22.4489	0	-inf	-nan	5.00E-05	0.00478824	sim

BRASSINOSTERÓIDES

<i>brassinosteroid-regulated protein(LOC547802)</i>	XLOC_045578	XLOC_045578	TRINITY_DN112542_ c0_g1_i1:0-646	Sintomático	Assintomático	5.05213	0	-inf	-nan	0.0009	0.0322965	sim
<i>RING/FYVE/PHD zinc finger superfamily protein(MS1)</i>	XLOC_100020	XLOC_100020	TRINITY_DN119264_ c0_g1_i2:0-453	Sintomático	Assintomático	0	16.9285	inf	-nan	0.0001	0.00820753	sim

Apêndice B

Géis SDS PAGE demonstrando o perfil proteico entre tecidos sadios e tecido doente de guarazeiro. A- extrato de proteínas de guarazeiro de flores sadia; B – extrato de proteínas de flores doente de guarazeiro. Foram utilizados 15 µg de extrato proteico em cada poço



Apêndice C

Proteínas relacionadas a proliferação celular

IDs Proteína guaranzeiro	Proteína	Descrição
g38799	<i>MCM2</i>	Componente do complexo MCM2-7 (complexo MCM) que pode funcionar como helicase de DNA
g3528	<i>MCM3</i>	Componente do complexo MCM2-7 (complexo MCM) que pode funcionar como helicase de DNA
g59795	<i>MCM4</i>	Componente do complexo MCM2-7 (complexo MCM) que pode funcionar como helicase de DNA
g19492	<i>MCM5</i>	Membro do complexo de manutenção do minicromossomo, envolvido na iniciação da replicação de DNA
g9923	<i>MCM6</i>	Componente do complexo MCM2-7 (complexo MCM) que pode funcionar como helicase de DNA
g24147	<i>PRL</i>	Membro do complexo de manutenção do minicromossomo, envolvido na iniciação da replicação de DNA
g20547	<i>PCNA2</i>	Está envolvida no controle da replicação do DNA
g60737	<i>RFC2</i>	Fator de replicação C subunita 2; Estar envolvido na replicação do DNA e, assim, regular a proliferação celular
g19016	<i>EMB1968</i>	Família <i>ATPase</i> , estar envolvido na replicação do DNA e, assim, regular a proliferação celular;
g81977	<i>EMB2810</i>	Fator de replicação C subunita 5
g11876	<i>EMB2775</i>	Família <i>ATPase</i> associada a diversas atividades celulares
g23449	<i>MAP65-1</i>	Reprime a organização do fuso metafásico e a transição para a anáfase na forma ativa desfosforilada
g60493	<i>RPA1A</i>	É essencial para a progressão normal através da meiose. Está envolvido na reparação de quebras dois fios de DNA
g42354	<i>AT4G31880</i>	Proteína não caracterizada; Localizada no citosol
g87528	<i>ATSMC2</i>	Componente central do complexo de condensação dos cromossomos (SMC)
g20453	<i>RPA70D</i>	Proteína de replicação necessário para recombinação, reparo e replicação de DNA.
g46138	<i>E2F1</i>	Expresso ao longo do ciclo celular. Abundância aumentada pela auxina através da estabilização da proteína.
g43625	<i>TOP1ALPHA</i>	DNA topoisomerase 1 alfa

Apêndice D

Proteínas diferencialmente abundantes em tecido floral doente de guaranazeiro

Ids das proteínas de guaranazeiro	N: Peptídeos	N: Score	<i>p-value</i>	Razão Doente_vs_Sadio	Direção
g79180	40	78.561	0.049659	-3.98	Down
g7562	29	25.856	0.006557	-3.39	Down
g37928	23	4.136	0.001434	-3.34	Down
g81004	27	31.256	0.012989	-2.88	Down
g605	24	4.9433	0.015948	-2.87	Down
g7168	28	2.4512	0.040555	-2.83	Down
g24728	47	99.281	0.038443	-2.8	Down
g30329	14	4.0665	0.048358	-2.79	Down
g60974	29	33.503	0.018902	-2.78	Down
g35460	20	18.2	0.000411	-2.77	Down
g20759	22	2.1418	0.049877	-2.76	Down
g71885	21	3.4415	0.047276	-2.72	Down
g37835	45	25.033	0.039364	-2.46	Down
g73722	34	10.825	0.040817	-2.44	Down
g43646	28	8.8139	0.021591	-2.43	Down
g8664	36	23.936	0.02369	-2.41	Down
g22024	13	9.2649	0.000228	-2.36	Down
g60693	3	13.837	0.002487	-2.35	Down
g9100	28	5.8033	4.66E-05	-2.26	Down
g27877	67	7.3143	0.025481	-2.17	Down
g20426	27	17.276	0.023034	-2.16	Down
g10882	29	3.2471	0.012725	-2.12	Down
g39535	28	5.7184	0.000291	-2.11	Down
g20439	56	5.1282	0.000129	-2.1	Down
g70461	23	7.3396	2.16E-05	-2.07	Down
g36243	22	36.481	0.004658	-2.05	Down
g50363	36	2.4839	0.041183	-2.05	Down
g15039	25	29.033	0.003797	-1.96	Down
g27215	53	6.6341	0.018147	-1.95	Down
g12044	19	3.0835	0.024475	-1.93	Down
g36396	17	12.639	0.027867	-1.92	Down
g34748	42	3.9036	0.004172	-1.87	Down
g31556	50	11.85	0.015352	-1.85	Down
g50576	21	24.029	0.001508	-1.85	Down
g34663	59	13.085	0.027177	-1.84	Down
g15715	34	7.6309	0.038467	-1.83	Down
g91887	10	3.9474	0.000172	-1.82	Down
g43969	19	6.509	0.018993	-1.8	Down
g59201	18	11.794	0.004128	-1.8	Down
g11401	40	16.414	0.034852	-1.79	Down
g7027	19	2.5994	0.005433	-1.77	Down

g22241	15	4.4358	0.040459	-1.76	<i>Down</i>
g24497	10	17.248	0.022767	-1.73	<i>Down</i>
g20833	41	10.552	0.029215	-1.72	<i>Down</i>
g28156	8	14.636	0.014801	-1.69	<i>Down</i>
g2358	18	8.0316	0.015729	-1.66	<i>Down</i>
g7810	22	12.987	0.015978	-1.61	<i>Down</i>
g11143	26	9.3377	0.020012	-1.56	<i>Down</i>
g27808	22	5.8137	0.015624	-1.56	<i>Down</i>
g26477	14	14.659	0.040549	-1.53	<i>Down</i>
g71618	38	21.349	0.028649	-1.51	<i>Down</i>
g8785	78	2.0888	0.023227	-1.51	<i>Down</i>
g6044	31	2.5907	0.027404	-1.49	<i>Down</i>
g64719	24	13.059	0.036745	-1.46	<i>Down</i>
g41086	28	21.042	0.049323	-1.44	<i>Down</i>
g57656	37	3.108	0.016822	-1.44	<i>Down</i>
g40306	48	4.8101	0.049838	-1.43	<i>Down</i>
g53674	29	32.47	0.002966	-1.43	<i>Down</i>
g57479	50	7.021	0.003625	-1.43	<i>Down</i>
g12096	34	10.113	0.017382	-1.37	<i>Down</i>
g68563	17	14.195	0.013189	-1.37	<i>Down</i>
g17375	34	4.5473	0.015585	-1.33	<i>Down</i>
g19683	30	239	0.013579	-1.33	<i>Down</i>
g39451	13	6.1214	0.027053	-1.33	<i>Down</i>
g32824	19	3.3487	0.03654	-1.32	<i>Down</i>
g24759	27	29.892	0.028921	-1.27	<i>Down</i>
g61290	17	5.5286	0.014605	-1.26	<i>Down</i>
g24494	35	213.12	0.042835	-1.25	<i>Down</i>
g69126	14	7.2496	0.041551	-1.25	<i>Down</i>
g85174	30	21.625	0.022182	-1.25	<i>Down</i>
g33543	49	16.858	0.004838	-1.22	<i>Down</i>
g88683	29	19.321	0.049003	-1.22	<i>Down</i>
g39083	31	95.594	0.007372	-1.2	<i>Down</i>
g74065	26	8.6821	0.036999	-1.16	<i>Down</i>
g30863	23	37.478	0.035722	-1.12	<i>Down</i>
g17021	17	11.526	0.016583	-1.06	<i>Down</i>
g54	27	11.365	0.025806	-1.03	<i>Down</i>
g78419	37	3.311	0.038486	-1.03	<i>Down</i>
g23798	23	5.9853	0.022786	-0.998	<i>Down</i>
g14284	25	6.8252	0.049444	-0.987	<i>Down</i>
g773	17	9.6946	0.025112	-0.987	<i>Down</i>
g27205	60	98.204	0.048413	-0.936	<i>Down</i>
g32347	37	95.25	0.034289	-0.903	<i>Down</i>
g3996	10	3.115	0.014479	-0.878	<i>Down</i>
g1123	8	5.8283	0.013767	-0.873	<i>Down</i>
g37198	8	13.083	0.034791	-0.823	<i>Down</i>
g13899	34	32.931	0.018302	-0.813	<i>Down</i>

g32670	56	50.945	0.045337	-0.8	<i>Down</i>
g66791	34	8.3093	0.035633	-0.796	<i>Down</i>
g32672	31	150.7	0.038569	-0.795	<i>Down</i>
g79037	29	100.49	0.041054	-0.793	<i>Down</i>
g56709	11	7.3392	0.032519	-0.788	<i>Down</i>
g10221	25	6.2101	0.009684	-0.784	<i>Down</i>
g62953	17	5.2666	0.027463	-0.773	<i>Down</i>
g70641	20	126.78	0.048927	-0.772	<i>Down</i>
g28833	15	13.747	0.016472	-0.766	<i>Down</i>
g60084	33	8.7804	0.015942	-0.762	<i>Down</i>
g13581	23	2.8886	0.011592	-0.747	<i>Down</i>
g62447	38	86.685	0.049367	-0.714	<i>Down</i>
g20238	26	29.308	0.023856	-0.695	<i>Down</i>
g12800	38	15.893	0.049743	-0.69	<i>Down</i>
g2965	24	14.738	0.046256	-0.686	<i>Down</i>
g24208	42	21.291	0.032957	-0.685	<i>Down</i>
g55017	35	17.636	0.027415	-0.675	<i>Down</i>
g3213	11	36.185	0.023315	-0.674	<i>Down</i>
g55027	24	7.9417	0.032461	-0.665	<i>Down</i>
g58618	22	10.7	0.043153	-0.645	<i>Down</i>
g19679	10	6.1734	0.026149	-0.628	<i>Down</i>
g83177	17	12.494	0.04262	-0.615	<i>Down</i>
g49769	15	6.4326	0.032372	-0.614	<i>Down</i>
g63138	17	5.685	0.032416	-0.604	<i>Down</i>
g5639	45	14.277	0.036077	-0.588	<i>Down</i>
g37346	37	64.433	0.039954	-0.571	<i>Down</i>
g49248	13	11.606	0.046488	-0.519	<i>Down</i>
g24001	37	125.62	0.04505	-0.481	<i>Down</i>
g30487	30	8.9635	0.044319	-0.438	<i>Down</i>
g70901	14	39.016	0.036909	0.477	<i>Up</i>
g6901	31	89.691	0.048746	0.507	<i>Up</i>
g15336	27	62.389	0.034451	0.524	<i>Up</i>
g32212	29	44.568	0.047251	0.535	<i>Up</i>
g48089	25	25.075	0.022144	0.537	<i>Up</i>
g31805	88	32.208	0.034171	0.54	<i>Up</i>
g74086	48	15.321	0.037132	0.554	<i>Up</i>
g13598	40	9.8552	0.035018	0.555	<i>Up</i>
g5629	11	13.241	0.039479	0.556	<i>Up</i>
g61846	25	132.54	0.046808	0.558	<i>Up</i>
g12898	16	46.397	0.043556	0.57	<i>Up</i>
g12674	27	105.64	0.022584	0.573	<i>Up</i>
g43618	14	75.615	0.035897	0.58	<i>Up</i>
g63034	37	323.31	0.044274	0.581	<i>Up</i>
g9677	3	66.242	0.04747	0.581	<i>Up</i>
g45004	49	323.31	0.0278	0.583	<i>Up</i>
g2434	13	54.134	0.042519	0.59	<i>Up</i>

g62732	41	25.889	0.026544	0.594	<i>Up</i>
g62504	10	27.493	0.021802	0.607	<i>Up</i>
g28576	47	46.287	0.026238	0.611	<i>Up</i>
g24355	15	49.437	0.04873	0.617	<i>Up</i>
g4615	52	11.647	0.036438	0.625	<i>Up</i>
g18126	33	38.048	0.022575	0.626	<i>Up</i>
g635	28	122.65	0.023842	0.638	<i>Up</i>
g23449	51	281.76	0.03488	0.652	<i>Up</i>
g11126	14	102.27	0.034842	0.657	<i>Up</i>
g1377	69	67.45	0.025693	0.657	<i>Up</i>
g72302	10	5.5925	0.045624	0.659	<i>Up</i>
g2867	31	323.31	0.026539	0.666	<i>Up</i>
g52201	33	14.647	0.042526	0.678	<i>Up</i>
g39465	42	29.635	0.017158	0.679	<i>Up</i>
g6116	36	72.377	0.010362	0.688	<i>Up</i>
g46462	56	43.138	0.019232	0.699	<i>Up</i>
g93665	14	23.343	0.01741	0.704	<i>Up</i>
g16948	22	26.035	0.037649	0.711	<i>Up</i>
g22514	9	8.5819	0.017686	0.732	<i>Up</i>
g20818	29	36.865	0.015496	0.733	<i>Up</i>
g13450	33	73.735	0.045735	0.735	<i>Up</i>
g19119	53	323.31	0.032377	0.756	<i>Up</i>
g54409	24	23.298	0.020514	0.776	<i>Up</i>
g21250	11	45.738	0.018435	0.785	<i>Up</i>
g40737	7	13.216	0.039745	0.799	<i>Up</i>
g49038	27	323.31	0.043294	0.81	<i>Up</i>
g13143	46	33.78	0.006418	0.816	<i>Up</i>
g27958	9	84.751	0.010509	0.816	<i>Up</i>
g31349	51	290.83	0.024468	0.828	<i>Up</i>
g32128	10	8.6402	0.013628	0.829	<i>Up</i>
g25208	14	22.629	0.03182	0.832	<i>Up</i>
g8303	26	104.49	0.011966	0.833	<i>Up</i>
g28057	22	49.441	0.049744	0.837	<i>Up</i>
g6372	35	323.31	0.010866	0.837	<i>Up</i>
g24764	10	13.801	0.021614	0.85	<i>Up</i>
g36239	15	46.562	0.02048	0.862	<i>Up</i>
g6370	30	188.61	0.002875	0.879	<i>Up</i>
g11093	16	295.87	0.003472	0.88	<i>Up</i>
g5135	20	4.7088	0.047589	0.895	<i>Up</i>
g24147	75	248.77	0.048466	0.918	<i>Up</i>
g23850	14	206.99	0.039761	0.919	<i>Up</i>
g11574	22	323.31	0.043534	0.963	<i>Up</i>
g58474	33	274.81	0.039196	0.965	<i>Up</i>
g2232	12	106.47	0.035761	0.966	<i>Up</i>
g7369	5	20.061	0.031983	0.978	<i>Up</i>
g65485	32	15.927	0.015021	1	<i>Up</i>

g58581	14	22.358	0.006726	1.07	<i>Up</i>
g25082	34	5.1299	0.019026	1.08	<i>Up</i>
g32147	30	55.513	0.04364	1.08	<i>Up</i>
g27143	11	7.8966	0.044564	1.1	<i>Up</i>
g27792	26	38.479	0.019665	1.11	<i>Up</i>
g8332	13	323.31	0.018862	1.12	<i>Up</i>
g38019	38	41.51	0.021123	1.13	<i>Up</i>
g44606	26	45.637	0.043753	1.13	<i>Up</i>
g4110	30	51.836	0.033828	1.14	<i>Up</i>
g11350	8	18.397	0.00878	1.15	<i>Up</i>
g41428	15	30.679	0.015661	1.17	<i>Up</i>
g6371	35	75.643	0.004093	1.18	<i>Up</i>
g9923	70	307.47	0.021566	1.2	<i>Up</i>
g44530	16	17.417	0.010852	1.21	<i>Up</i>
g20453	38	5.4917	0.041924	1.22	<i>Up</i>
g25930	41	4.9509	0.00454	1.24	<i>Up</i>
g21719	18	1.9983	0.016613	1.25	<i>Up</i>
g18357	8	4.8042	0.026081	1.26	<i>Up</i>
g2297	22	27.847	0.01413	1.28	<i>Up</i>
g68082	36	323.31	0.03672	1.28	<i>Up</i>
g37793	27	141	0.003255	1.3	<i>Up</i>
g44970	10	6.8244	0.025959	1.3	<i>Up</i>
g48657	23	5.3567	0.046402	1.3	<i>Up</i>
g17098	29	10.423	0.046961	1.31	<i>Up</i>
g3653	86	323.31	0.038107	1.31	<i>Up</i>
g16678	77	85.666	0.021733	1.32	<i>Up</i>
g27831	28	249.22	0.021577	1.32	<i>Up</i>
g77007	20	40.346	0.013827	1.35	<i>Up</i>
g39807	25	3.5194	0.016621	1.36	<i>Up</i>
g47277	14	51.69	0.007816	1.36	<i>Up</i>
g58251	13	8.2533	0.035197	1.39	<i>Up</i>
g4998	29	5.6357	0.019724	1.43	<i>Up</i>
g81045	21	2.7046	0.049911	1.43	<i>Up</i>
g19536	34	13.748	0.027992	1.44	<i>Up</i>
g61414	17	323.31	0.003804	1.44	<i>Up</i>
g3349	50	204.27	0.04663	1.45	<i>Up</i>
g26077	32	127.66	0.020407	1.47	<i>Up</i>
g31071	55	9.6855	0.044056	1.49	<i>Up</i>
g60577	16	220.14	0.002486	1.51	<i>Up</i>
g4096	37	13.27	0.024744	1.53	<i>Up</i>
g6104	28	14.657	0.001085	1.54	<i>Up</i>
g60785	29	10.516	0.015207	1.56	<i>Up</i>
g7365	4	3.8508	0.023985	1.6	<i>Up</i>
g43366	20	54.358	0.017525	1.63	<i>Up</i>
g33292	27	8.7288	0.003921	1.71	<i>Up</i>
g11965	42	13.518	0.049541	1.72	<i>Up</i>

g64829	6	5.4175	0.013894	1.72	<i>Up</i>
g42354	77	138.11	0.047605	1.78	<i>Up</i>
g71075	58	13.309	0.040046	1.85	<i>Up</i>
g25038	26	89.159	0.005738	1.86	<i>Up</i>
g6344	18	323.31	0.003565	1.88	<i>Up</i>
g29754	22	7.9184	0.025629	1.91	<i>Up</i>
g166	9	194.17	0.010897	1.92	<i>Up</i>
g77856	63	2.7691	0.020575	1.93	<i>Up</i>
g57732	27	3.3154	0.042101	1.96	<i>Up</i>
g7986	28	8.3269	0.048497	1.99	<i>Up</i>
g9952	70	86.563	0.045917	2	<i>Up</i>
g40851	20	14.726	0.000326	2.12	<i>Up</i>
g71711	41	4.6905	6.55E-05	2.17	<i>Up</i>
g77586	20	3.1969	0.026601	2.17	<i>Up</i>
g38799	71	40.911	0.000124	2.19	<i>Up</i>
g65961	42	323.31	0.030984	2.2	<i>Up</i>
g9179	15	38.878	0.012606	2.21	<i>Up</i>
g60493	37	4.0084	0.000217	2.32	<i>Up</i>
g46277	49	137.3	0.010131	2.43	<i>Up</i>
g73704	21	41.345	0.001344	2.49	<i>Up</i>
g44437	14	3.4461	0.00109	2.59	<i>Up</i>
g9333	79	19.623	0.046208	2.65	<i>Up</i>
g87528	91	8.2813	0.038458	2.74	<i>Up</i>
g7953	75	31.125	0.029535	2.78	<i>Up</i>
g24119	11	11.159	0.005584	2.88	<i>Up</i>
g7866	19	3.4588	0.02812	3.17	<i>Up</i>
g2238	12	43.865	4.3E-05	3.63	<i>Up</i>
g6341	14	11.418	0.000116	3.71	<i>Up</i>

Anexo I

Protocolo de extração de proteínas método SDS-Fenol (SOUZA et al., 2014)

Esse método divide-se em duas etapas: limpeza da amostra, a fim de neutralizar e remover interferentes potencialmente oxidativos e a extração propriamente dita. Para a limpeza da amostra foi adicionado ao pó 10 mL de solução I (10 % TCA, 2 % β -mercaptoetanol em acetona gelada). A mistura foi homogeneizada com auxílio de disruptor ultrassônico *Fisher 100 Sonic Dismembrator* em banho de gelo (três pulsos de vinte segundos a intervalos de um minuto cada). A precipitação de proteínas foi obtida incubando a amostra a -20 °C por aproximadamente 40 min seguido de centrifugação durante 30 min, 4.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado em 10 mL de acetona gelada, para novamente ser centrifugado, durante 10 min, 4.000 rpm a 4 °C. A etapa de lavagem foi realizada por duas vezes, o *pellet* foi seco à temperatura ambiente por 30 a 40 min, e procedeu-se à extração de proteínas.

Para a extração de proteínas, o *pellet* foi aliqotado em microtubos de 1,5 mL, (na marca de 0,2 mL) seguido de adição de 600 μ L de solução II (30 % sacarose; 2 % SDS; 0,1 M Tris-HCl pH, 7,5; 2 % β -mercaptoetanol). A mistura foi homogeneizada em vortex durante 30s e deixada à temperatura ambiente por 15 min, agitando-se em vórtex algumas vezes. Posteriormente, foram adicionados 600 μ L de fenol hidratado e equilibrado (pH 7,5) e agitaram-se as amostras em vórtex durante 20s para que ocorresse a solubilização das proteínas no fenol. Após 5 min à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 10.000 rpm a 4 °C para separação de fases. A fase fenólica foi então recuperada e a ela foram adicionados três volumes de 0,1 M de acetato de amônio em metanol. A precipitação ocorreu por 1 h a -20 °C. As proteínas precipitadas foram recuperadas por centrifugação, 10 min a 10.000 rpm a 4 °C, e lavadas com dois volumes de metanol gelado por três vezes. O *pellet* foi seco à temperatura ambiente por aproximadamente 15 min, cuidando para não ficar muito seco, e estocado a -20 °C até o momento de uso.