

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Análise da variabilidade e perfil de expressão das quitinases de cana-de-açúcar durante a infecção por *Sporisorium scitamineum*

Enrico Diniz Rodrigues Batista

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2023

Enrico Diniz Rodrigues Batista
Engenheiro Biotecnológico

Análise da variabilidade e perfil de expressão das quitinasases de cana-de-açúcar durante a infecção por *Sporisorium scitamineum*

Orientadora:
Prof^ª Dr.^a. **CLAUDIA BARROS MONTEIRO VITORELLO**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Batista, Enrico Diniz Rodrigues

Análise da variabilidade e perfil de expressão das quitinases de cana-de-açúcar durante a infecção por *Sporisorium scitamineum* / Enrico Diniz Rodrigues Batista. - - Piracicaba, 2023.

61 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. AlphaFold 2. Carvão-da-cana 3. Interação planta-patógeno 4. Interação proteína-proteína 5. Doença da cana-de-açúcar I. Título

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à Universidade de São Paulo e à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP) pela oportunidade de cursar o mestrado. Agradeço também o Departamento de Genética, especialmente a todos os professores, colegas e funcionários.

Agradeço às instituições de financiamento pelo suporte financeiro e pela concessão da bolsa de estudo, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

Com muito carinho e apreço, gostaria de agradecer à minha orientadora, Dr^a. Claudia Barros Monteiro Vitorello, por toda a dedicação e preocupação com a minha formação como cientista e cidadão. Todo o seu apoio profissional e pessoal foram essenciais na minha jornada, e seu entusiasmo e paixão pela ciência e conhecimento vão ser sempre uma fonte de inspiração para mim.

Também agradeço especialmente aos colegas Jéssica Fernanda Mendes, João Vitor Ferro Mazzei e Thaís Dal'Sasso por terem contribuído ativamente com o desenvolvimento deste trabalho. Terminar essa dissertação jamais seria possível sem vocês.

A todos os membros do Genomics Group: Ana Julia Franceschi, Elaine Vidotto, Gabriela Romêro Campos, Gustavo Crestana, Gustavo Hussein, Gustavo Lima, Hugo Rody, Jéssica Fernanda Mendes, João Vitor Ferro Mazzei, Jonathan Macedo, Joyce Ferreti, Maria Juliana Calderan, Marcella Ferreira, Mauricio Jampani, Pedro Vilanova, Renato Bombardelli, Tiarla Souto e Thaís Dal'Sasso. Obrigado por terem me acolhido desde o meu primeiro dia no laboratório, e pelo suporte durante todos os momentos de dificuldades que surgiram ao longo do caminho.

Agradeço aos membros da banca examinadora por aceitarem este convite e contribuírem para este trabalho e para minha carreira profissional.

Finalmente, agradeço à minha mãe, Cintia Carvalho Diniz. Obrigado por sempre apoiar e confiar nas minhas decisões pessoais e profissionais, e fazer tudo ao seu alcance para que eu chegasse até aqui.

“Scientific research is one of the most exciting and rewarding of occupations. It is like a voyage of discovery into unknown lands, seeking not for new territory but for new knowledge. It should appeal to those with a good sense of adventure.”

-Frederick Sanger

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
1. A cana-de-açúcar	9
2. O carvão-da-cana, causado pelo fungo <i>Sporisorium scitamineum</i>	10
3. Interação molecular patógeno-hospedeiro	13
4. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo para o patossistema cana-carvão.....	16
5. Detecção de interações proteína-proteína	17
6. Predição de estruturas de proteínas e complexos com o AlphaFold2.....	19
7. Validação das interações proteína-proteína com BiFC.....	21
Referências.....	22
2 ANÁLISE DA VARIABILIDADE E PERFIL DE EXPRESSÃO DAS QUITINASES DE CANA-DE-AÇÚCAR DURANTE A INFECÇÃO POR <i>Sporisorium scitamineum</i>	31
Resumo	31
1. Introdução	31
2. Materiais e Métodos.....	35
2.1 Obtenção dos conjuntos de dados	35
2.2 Anotação de quitinases.....	35
2.3 Análise filogenética.....	36
2.4 Predição estrutural.....	36
2.5 Perfis de expressão de quitinases	36
3. Resultados	37
3.1 Identificação e filogenia dos transcritos de quitinase de cana-de-açúcar.....	37
3.2 Análise das sequências das quitinases.....	39
3.4 Predição e comparação das estruturas das quitinases através AlphaFold2	43
3.5 Interação proteína-proteína de uma quitinase de classe I com um candidato a efetor de <i>Sporisorium scitamineum</i>	46
3.6 Padrão de expressão das quitinases em resposta à infecção por <i>S. scitamineum</i>	47
4. Discussão	50
5. Considerações Finais e Perspectivas Futuras.....	54
Referências.....	55

RESUMO

Análise da variabilidade e perfil de expressão das quitinases de cana-de-açúcar durante a infecção por *Sporisorium scitamineum*

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes para a agricultura brasileira. Ela é matéria prima para vários produtos como açúcar, etanol e biopolímeros. Dentre as doenças que mais podem prejudicar o cultivo dessa planta, está o carvão-da-cana causado pelo fungo *Sporisorium scitamineum*. Para se desenvolver e reproduzir, esse patógeno sequestra o metabolismo da planta, causando uma grande mudança em seu perfil transcricional e proteico, diminuindo sua taxa de conversão de açúcar e crescimento. O principal sinal dessa doença é a formação de uma estrutura chamada chicote, formado por teliósporos e tecidos da planta. Ela, por outro lado, desenvolveu um complexo sistema imune capaz de detectar e gerar respostas de defesa contra o patógeno. Para tal, a planta secreta uma série de compostos que incluem as proteínas relacionadas à patogênese (PR). As proteínas PR são subdivididas em 17 famílias diferentes conforme a semelhança de função e sequência. Quatro famílias de PR (PR3/4/8/11) são formadas por proteínas capazes de digerir a quitina da parede celular fúngica chamadas de quitinases. Essas proteínas são importantes para o sistema imune da planta porque, dentre outros mecanismos, elas liberam quitoligossacarídeos a partir da quebra da quitina que são reconhecidos por receptores de membrana. O reconhecimento dessas moléculas leva ao desencadeamento de respostas como lignificação e espessamento da parede celular vegetal, produção de espécies reativas de oxigênio e morte celular programada. Por conter um genoma poliploide altamente complexo, caracterizar e entender a função dessas proteínas no contexto da interação cana-carvão é uma tarefa complexa. Isto posto, este trabalho buscou avaliar a variabilidade das quitinases de cana-de-açúcar presentes em um banco de transcriptoma montados *de novo*, e investigar seu perfil de expressão durante a infecção por *Sporisorium scitamineum* em duas variedades diferentes (SP80-3280 e IAC 6-66). Foram identificados no banco 16 transcritos que se dividem filogeneticamente em duas famílias com domínios glicosil-hidrolase (GH) diferentes – GH18 e GH19, mais uma família com domínio Barwin. Essas das famílias GH se subdividiram em outras cinco classes (I-V) com base em sua estrutura. A análise dos resíduos catalíticos encontrou que seis deles não apresentam o glutamato responsável pela atividade catalítica da enzima. Foi realizada também a previsão estrutura tridimensional de seis quitinases através do AlphaFold2. Essa predição revelou que as quitinases de cana seguem o padrão de estrutura observada em outras plantas, com algumas particularidades. Após isso, uma quitinase de classe I foi escolhida para uma simulação de interação com o candidato a efetor (CE) g5159 usando o AlphaFold-Multimer. Na simulação foi observado que o CE provavelmente apresenta dois domínios de desordem intrínseca e que um deles participa da interação que bloqueia o sulco catalítico da quitinase. Finalmente, a análise da expressão dessas proteínas em plantas infectadas mostrou que há uma modulação do perfil transcricional das quitinases de cana pelo fungo.

Palavras-chave: AlphaFold, Carvão-da-cana, Interação planta-patógeno, Interação proteína-proteína

ABSTRACT

Variability and expression profile analysis of sugarcane chitinases in response to *Sporisorium scitamineum* infection

Sugarcane is one of the most important crops for Brazilian agriculture. It is a raw material for various products such as sugar, ethanol, and biopolymers. Among the diseases that can cause many losses to this crop is sugarcane smut caused by the fungus *Sporisorium scitamineum*. In order to develop and reproduce, this pathogen hijacks the plant's metabolism, causing significant changes in its transcriptional and proteic profile, reducing its sugar conversion rate and growth. The main sign of this disease is the development of a structure called whip that consists of teliospores and plant tissues. On the other hand, the plant has evolved a complex immune system capable of detecting pathogens and induce defense responses. The plant secretes a series of compounds that include pathogenesis-related (PR) proteins. PR proteins are subdivided into 17 different families based on their function and sequence similarity. Four PR families (PR3/4/8/11) are composed of proteins capable of digesting the chitin in the fungal cell wall, called chitinases. These proteins are important for the plant's immune system since they release chitooligosaccharides by breaking down chitin, which are recognized by membrane receptors. Recognition of these molecules triggers responses such as lignification, thickening of the plant cell wall, production of reactive oxygen species, and programmed cell death. Due to the highly complex polyploid genome of sugarcane, characterizing and understanding the function of these proteins in the sugarcane-smut pathosystem is a challenging task. Therefore, this study aimed to evaluate the variability of sugarcane chitinases present in a *de novo* assembled transcriptome database. The expression profile during *Sporisorium scitamineum* infection in two different varieties (SP80-3280 and IAC 6-66) was also investigated. Sixteen putative chitinases transcripts were identified in the database. They were phylogenetically divided into two families with different glycosyl hydrolase (GH) domains - GH18 and GH19, plus one family with a Barwin domain. These GH families were further subdivided into five classes (I-V) based on their structure. Analysis of the catalytic residues found that six of them lack the glutamate responsible for the catalytic activity of the enzyme. Three-dimensional structure prediction of six chitinases was also performed using AlphaFold2. This prediction revealed that sugarcane chitinases follow the structure pattern observed in other plants, with a few peculiarities. Subsequently, a class I chitinase was chosen for interaction simulation with the candidate effector (CE) g5159 through AlphaFold-Multimer. This simulation revealed that the CE likely has two domains of intrinsic disorder and one of them participate in the interaction blocking the chitinase's catalytic groove. Finally, the analysis of the expression of these proteins in infected plants showed that there is modulation of the transcriptional profile of sugarcane chitinases by the fungus.

Keywords: AlphaFold, Sugarcane smut, Plant-pathogen interaction, Protein-protein interaction

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. A cana-de-açúcar

Cana-de-açúcar é o nome popular dado a um grupo de gramíneas cultivadas que têm a capacidade de armazenar grandes quantidades de sacarose. A divisão do grupo ainda é debatida na literatura, mas geralmente se reconhece seis espécies dentro do gênero *Saccharum*. As duas espécies sempre reconhecidas (*Saccharum spontaneum* L. e *Saccharum robustum*) são selvagens, enquanto as outras quatro espécies (*S. barberi*, *S. edule*, *S. officinarum*, e *S. sinense*) são cultivadas (Moore et al., 2013)

As variedades modernas de *Saccharum* foram obtidas a partir de hibridização interespecífica (Amalraj e Balasundaram, 2006). *Saccharum officinarum* foi provavelmente domesticada na Nova Guiné a partir da selvagem *S. robustum*. Cruzamentos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* originaram *S. barberi* na Índia, e *S. sinense* na China (Henry, 2010). Um estudo recente destaca que a origem das plantas de cana-de-açúcar modernas se deu a partir de três genomas fundadores, e que a origem de *S. robustum* (e conseqüentemente de *S. officinarum*) aconteceu a partir de eventos de hibridização seguidos de aloploidização (Pompidor et al., 2021).

Uma característica importante que distingue os vários membros do gênero *Saccharum* é a capacidade de acumular sacarose, variando de baixos níveis nas espécies selvagens *S. robustum* e *S. spontaneum*, a altos níveis nas espécies cultivadas *S. officinarum*, *S. barberi* e *S. sinense* (Moore et al., 2014). Acredita-se que as variedades atuais de cana-de-açúcar foram obtidas a partir do cruzamento entre *S. officinarum*, que conferiu o alto nível de produção de sacarose, e *S. spontaneum*, que conferiu resistência a doenças (Grivet and Arruda, 2002).

As espécies cultivadas contam com alto nível de poliploidia e aneuploidia, com cerca de 120 cromossomos. Como o número básico de cromossomos de *S. officinarum* ($x = 10$) e *S. spontaneum* ($x = 8$) são diferentes, observa-se que duas organizações cromossômicas distintas coexistem no genoma das variedades modernas (D'Hont et al., 1996). Devido a essa complexidade genômica, a produção de canas transformadas que expressam níveis estáveis de um transgene é uma tarefa laboriosa (Henry, 2010).

A cana-de-açúcar é provavelmente a cultura mais importante usada na produção de energia, seja através da produção de biocombustíveis ou da queima direta para produção de eletricidade. Além disso, aproximadamente 70% do açúcar consumido no mundo é produzido a partir dessa planta (Tew and Cobill, 2008). O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido de Índia, China, Tailândia, Paquistão e México (FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020). A produção doméstica dessa cultura é liderada pela região sudeste

responsável pela produção de 366,9 milhões de toneladas de cana processadas em 2022, o que representou cerca de 62% da produção nacional. A produção brasileira de etanol em 2022 foi de 30 bilhões de litros, enquanto a produção de açúcar foi por volta de 35,05 milhões de toneladas (CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento, 2022).

Diversos desafios precisarão ser enfrentados para aumentar a produção de cana-de-açúcar no Brasil de maneira sustentável nos próximos anos. Além de pressões abióticas trazidas pelas mudanças climáticas, existe também a ação de pragas e patógenos, que já causam prejuízos e impactam negativamente a produtividade dessa cultura. Entre as doenças que mais atacam a cultura no Brasil estão a ferrugem alaranjada da cana (*Puccinia kuehnii*), ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala*), escaldadura das folhas (*Xanthomonas albilineans*), doença do mosaico (vírus do mosaico da cana) e o carvão (*Sporisorium scitamineum*) (Cursi et al., 2022).

2. O carvão-da-cana, causado pelo fungo *Sporisorium scitamineum*

As doenças de plantas conhecidas como "carvão" são causadas por fungos fitopatogênicos biotróficos da ordem *Ustilaginales* que geralmente afetam gramíneas e acarretam perdas significativas na qualidade e produtividade das culturas (Horst, 2013). Existem cerca de 1.500 espécies conhecidas dentro da ordem dos *Ustilaginales*, sendo um dos maiores grupos de fitopatógenos. Sua principal característica é a produção de teliosporos pretos, geralmente situados nos órgãos florais do hospedeiro (Zuo et al., 2019).

O carvão-da-cana, causado pelo fungo *Sporisorium scitamineum*, é uma das doenças mais importantes da cultura da cana, e pode causar perdas de produtividade consideráveis nas variedades suscetíveis (Bhuiyan et al., 2021). A primeira descrição de incidência desta doença foi em 1877 na África do Sul, e até a década de 1950 acreditava-se que o carvão estava confinado no oriente. A partir da segunda metade do século XX, a doença se espalhou por todo o mundo, incluindo casos na Austrália, Estados Unidos, Caribe, América Central, e Brasil (Sundar et al., 2012).

Por apresentar um metabolismo C4, uma planta saudável de cana-de-açúcar com uma taxa fotossintética normal é capaz de produzir altos níveis de açúcar. Todavia, uma vez infectada por *S. scitamineum*, a taxa fotossintética e metabolismo de açúcar reduzem drasticamente (Rajput et al., 2021). O patógeno causa grandes danos na cultura da cana quantitativa e qualitativamente, reduzindo radicalmente a altura e diâmetro da cana, o brix, a polaridade, a pureza, e a taxa de recuperação de açúcar (Mansoor et al., 2016).

Os principais meios de dispersão do carvão-da-cana são através de esporos carregados pelo vento e de ferramentas, como também mudas contaminadas (Sathe et al., 2009). O patógeno

causa intensas mudanças na fisiologia da planta, o que gera o desenvolvimento do sintoma mais característico da doença, uma estrutura de cor escura em forma de chicote composta por tecido vegetal e teliósporos (Marques et al., 2016). Devido à mudança em seu metabolismo, as plantas infectadas podem ter seu crescimento comprometido, apresentando baixo tamanho, brotos finos e presença de galhas (Croft et al., 2000; Bhuiyan et al., 2021).

O carvão-da-cana é principalmente uma doença meristemática, assim o patógeno só infecta e se propaga em tecidos jovens e em crescimento (Rajput et al., 2021). A estrutura do chicote consiste em um núcleo central espesso cercado por uma camada de esporos marrons e pretos, que por sua vez são cobertos por uma membrana. À medida que o chicote amadurece, a membrana se rompe, liberando os esporos, que são dispersos pelo vento para infectar outras plantas; chicotes individuais produzem bilhões de esporos por dia por até três meses (Croft et al., 2000).

S. scitamineum possui três fases em seu ciclo de vida (Figura 01), semelhante a outros fungos da mesma ordem: durante a primeira fase o fungo apresenta células leveduriformes saprófitas haploides (n); a segunda fase se inicia quando duas células haploides sexualmente compatíveis se cruzam, originando uma hifa dicariótica (n + n) capaz de infectar a planta; na terceira fase ocorre a fusão dos núcleos, gerando teliósporos diploides no chicote que são dispersados pelo vento. Quando os teliósporos entram em contato com o tecido saudável de outra planta, eles germinam formando um probasídio do qual se originam quatro basidiósporos através de meiose (Singh et al., 2004; Taniguti et al., 2015).

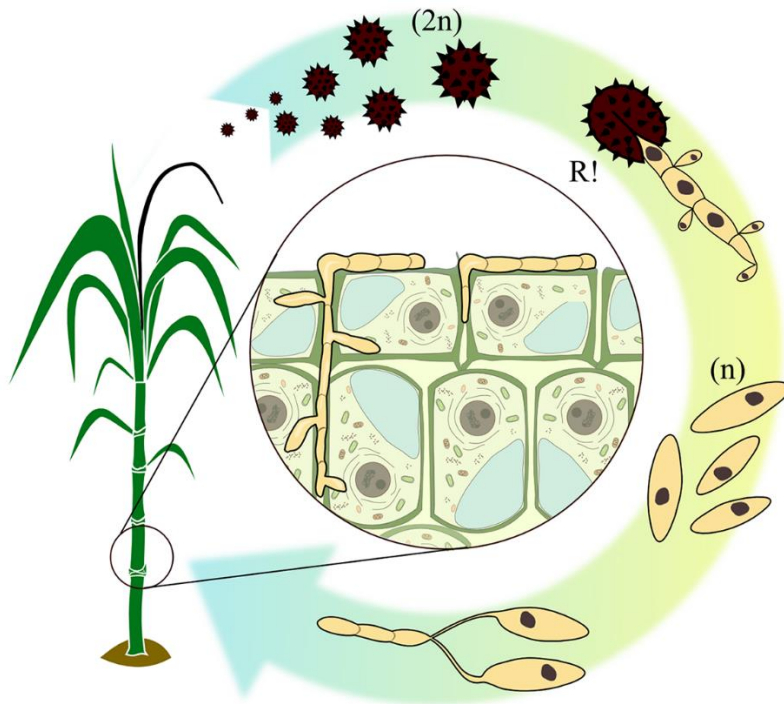


Figura 1. Estágios de desenvolvimento no ciclo de vida de *Sporisorium scitamineum*. (2n) teliosporos diploides, (n) haploides células de levedura após a meiose (R!); fusão da hifa (Adaptado de Taniguti et al., 2015)

Os genes associados aos tipos de reação sexual são essenciais para o ciclo de vida do fungo, uma vez que é necessária a fusão de células compatíveis para formar as hifas dicarióticas infectivas. *S. scitamineum*, apresenta dois tipos de reações sexuais (“+” e “-“, ou MAT1 e MAT2), e o acasalamento só ocorre quando há o reconhecimento dos feromônios de um tipo pelos receptores do outro (Yan et al., 2016). Os processos de acasalamento e patogenicidade são regulados por dois loci: a e b. O locus a consiste em genes que codificam um sistema de feromônio-receptor necessário para o reconhecimento e fusão de hifas, enquanto o locus b compreende dois genes que codificam subunidades de um fator de transcrição heterodimérico que regula a manutenção e crescimento da hifa dicariótica (Taniguti et al., 2015)

As plantas apresentam um sistema imune que evoluiu para frear a infecção por patógenos como o *S. scitamineum*. Geralmente, a célula vegetal é capaz de reconhecer padrões moleculares, o que dispara uma série de reações em cascata, promovendo, por exemplo, a indução da expressão de genes de defesa. Os patógenos, por outro lado, evoluíram efetores para bloquear o sistema imune das células, promovendo a infecção (Jones and Dangl, 2006).

Alguns estudos já foram realizados visando elucidar com mais detalhes a interação molecular entre a cana-de-açúcar e o *S. scitamineum*. Análises de proteoma e transcriptoma revelaram diversos genes e proteínas que são diferencialmente expressos na planta durante a infecção e possíveis efetores que o fungo utiliza para suprimir as respostas da planta (Que et

al., 2014; Schaker et al., 2016; Su et al., 2016). A cana-de-açúcar sofre uma ampla mudança em seu perfil transcricional logo no começo do desenvolvimento da doença. Nas primeiras seis horas de infecção, os genótipos resistentes exibem uma resposta robusta contra a infecção pelo fungo. Para retardar a proliferação do carvão, a planta apresenta uma explosão oxidativa e alterações nos seus compostos antioxidantes que prejudicam o desenvolvimento das estruturas necessárias para o estabelecimento da infecção (Peters et al., 2020).

Os genes da classe das proteínas PR10 (*pathogenesis related*), HCTI (hydroxycinnamoyltransferase) e ScChi (quitinase) são up-regulados em variedades resistentes no início da infecção, indicando que a deposição de lignina pode ser uma via para frear a ação do fungo (Hidayah et al., 2021). Em relação à quitinase, resultados similares foram observados analisando a expressão gênica de ScChi de variedades resistentes durante a infecção por carvão (Su et al., 2014). Um ortólogo de ScChi de cana já foi identificado como um possível alvo de g5159, um candidato a efetor (Teixeira-Silva et al., 2020).

Apesar dos avanços na descrição desse patossistema, muitas questões ainda precisam ser elucidadas. Os dados de transcriptoma disponíveis revelam candidatos a efetores e proteínas da planta que possivelmente atuam na defesa contra a infecção por *S. scitamineum*. Ainda assim, essas interações precisam ser validadas antes que seja possível traçar um mapa confiável dos processos moleculares que ocorrem durante a doença.

3. Interação molecular patógeno-hospedeiro

A interação molecular entre plantas e patógenos é tão diversa quanto os patossistemas existentes, sendo especialmente diferente quando comparamos os patógenos necrotróficos, cuja infecção leva à morte do hospedeiro, e os biotróficos. De maneira geral, os biotróficos dependem do tecido vivo de seu hospedeiro para sobreviverem, e mantêm a planta hospedeira viva suprimindo constantemente seus mecanismos de defesa constitutivos e sistema imune (Glazebrook, 2005).

A infecção por um fungo biotrófico geralmente começa quando um teliósporo encontra a superfície de uma planta. Sinais físico-químicos, como a hidrofobicidade dos ácidos graxos presentes na cutícula da folha, são percebidos pelas células fúngicas e desencadeiam a germinação do esporo. Os apressórios são uma das primeiras estruturas formadas, e mediam a entrada das hifas nos tecidos da planta por meio da penetração das células epidérmicas (Tucker and Talbot, 2001).

Após a penetração, as hifas atravessam as células epidérmicas e causam a invaginação da membrana celular da célula hospedeira. *S. scitamineum* não desenvolve haustórios como

outros fungos biotróficos, mas sim hifas intracelulares convolutas, semelhantes às de *S. reilianum*, que podem se espalhar de célula a célula (Marques et al., 2016; McNeil et al., 2018). Essa zona de contato entre as hifas fúngicas e a membrana plasmática da planta é onde ocorre a troca de nutrientes e moléculas sinalizadoras (Doehlemann et al., 2011).

As plantas apresentam vários mecanismos de defesa para impedir que os patógenos se desenvolvam em seus tecidos. O apoplasto, por exemplo, é um ambiente hostil, com produção e secreção constante de proteases, inibidores de protease, metabólitos secundários e enzimas hidrolíticas pelas plantas. Essa região também é monitorada por receptores imunes localizados na superfície celular capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do Inglês “*pathogen associated molecular patterns*”), como a quitina. Tal reconhecimento ativa a primeira linha do sistema imune da planta, a imunidade mediada por padrões (PTI, do Inglês “*pattern-triggered immunity*”) (Jaswal et al., 2020; Rocafort et al., 2020). Há ainda uma segunda linha de imunidade mediada por efetores (ETI, do inglês “*effector-triggered immunity*”), que é mais específica no reconhecimento de moléculas intracelulares (Jaswal et al., 2020). É importante ressaltar que as vias de sinalização das duas linhas do sistema imune são altamente interdependentes. Estudos recentes mostraram que PTI e ETI se potencializam mutuamente e que, quando uma via não é ativada, a outra fica comprometida (Ngou et al., 2021).

No caso dos fungos fitopatogênicos, monômeros e oligômeros de quitina são padrões moleculares centrais na interação patógeno-hospedeiro. A quitina é o principal componente da parede celular fúngica e extremamente abundante na natureza, também estando presente no exoesqueleto de insetos, ovos de nematoides e células de ameba. Assim, esse polímero é alvo de diversas quitinases das plantas, e seus oligômeros são reconhecidos por receptores apoplásticos que ativam o sistema imune (Vaghela et al., 2022). O primeiro gene clonado de um receptor de quitina foi o CEBiP, que codifica a proteína ligante de quitina no arroz. CEBiP é um receptor localizado na superfície celular, possui motivos de lisina extracelulares e não possui um domínio de sinalização citoplasmática (Kaku et al., 2006). Esse receptor se liga diretamente à oligômeros longos de quitina que estabelecem a homodimerização de CEBiP, à medida que o ectodomínio de dois monômeros de CEBiP se ligam ao oligossacarídeo. O dímero de CEBiP provavelmente recruta a OsCERK1 (quinase receptor de quitina de *Oryza sativa*), que é fosforilada e, assim, desencadeia a resposta imune (Hayafune et al., 2014).

Para estabelecer a colonização do hospedeiro, os patógenos secretam efetores que, dentre outras funções, modificam os processos imunológicos e metabólicos da planta a seu favor. Esses efetores podem ser proteínas, enzimas, RNAs pequenos, metabólitos secundários,

dentre outras classes de moléculas (Dodds e Rathjen, 2010). Eles desempenham um papel crucial em todas as etapas da infecção, desde a penetração epidérmica até o crescimento apoplástico e intracelular. Essas moléculas estão constantemente sujeitas à pressão seletiva do sistema imunológico do hospedeiro, e seus genes são os que evoluem mais rapidamente no genoma do patógeno (Zuo et al., 2019).

Os efetores possuem diferentes locais de atuação e podem ser classificados em duas principais categorias: citoplasmáticos e apoplásticos. Os efetores apoplásticos podem, por exemplo, proteger o patógeno de ser percebido pelos receptores de membrana que desencadeiam a resposta imune. Eles são geralmente menores e possuem uma maior quantidade de cisteína em comparação aos efetores citoplasmáticos (Jaswal et al., 2020). Os efetores citoplasmáticos são acumulados na interface entre as células fúngicas e a membrana celular da célula vegetal. Estruturalmente eles apresentam um tamanho relativamente grande e baixo teor de cisteína (Selin et al., 2016).

No caso da percepção da quitina, os patógenos desenvolveram diversos efetores para evitar seu reconhecimento e a ativação de respostas imunes. Esses efetores mediam modificações na composição e estrutura das paredes celulares, alterações nas cadeias de carboidratos ou direcionam as respostas imunes do hospedeiro. Existe um grupo de efetores com domínios LysM comumente encontrados em fungos que possuem e interferem na ativação dos receptores imunes de quitina. Eles podem prevenir o reconhecimento da quitina, ligando-se a ela, ou a formação de complexos de receptores, como é o caso do efector Ecp6 de *C. fulvum* (Sánchez-Vallet et al., 2015).

Os carvões compartilham um conjunto central de efetores, incluindo 72 famílias com domínios preditos e 24 sem domínio predito. Esses efetores conservados facilitam a infecção inicial do hospedeiro e supressão das respostas imunes inatas das plantas (Zuo et al., 2019). Um exemplo emblemático desse conjunto é o efector Pep1. Essa proteína é necessária em *U. maydis* para suprimir explosões oxidativas desencadeadas por peroxidases apoplásticas (Doehlemann et al., 2009).

Poucos efetores de *S. scitamineum* foram identificados e descritos até então. Recentemente, um grupo de pesquisa caracterizou o efector SsPEP1, um homólogo do Pep1 de *U. maydis*, revelando que sua ação na patogenicidade e desenvolvimento de sintomas é dependente de dosagem alélica. A deleção de um alelo do gene acarreta no desenvolvimento de um chicote branco com poucos teliosporos; enquanto a deleção de ambos os alelos inibe o desenvolvimento do chicote. Além disso, foi identificado que SsPEP1 é um potente inibidor da

atividade da peroxidase POD-1a da cana-de-açúcar, função análoga ao seu homólogo em *U. maydis* (Lu et al., 2021).

No grupo “Genomics”, já foi investigado a capacidade de candidatos a efetores (ECs) de suprimir as respostas imunes da cana-de-açúcar e determinaram ECs que poderiam suprimir PTI e/ou ETI. Foi demonstrado que o candidato g5159 é potente um supressor de PTI quando presente em células de *Nicotiana benthamiana*, além de suprimir ETI (Maia et al., 2022). A análise da localização subcelular dessa proteína através de sua fusão com uma GFP e subsequente expressão transitória em folhas de *N. benthamiana*, revelou uma ligação com a parede celular da planta. Um ensaio de co-imunoprecipitação seguido de espectrometria de massa revelou que g5159 possui alguns potenciais interatores, sendo o mais relevante uma endoquitinase (Teixeira-Silva et al., 2020).

4. *Arabidopsis thaliana* como modelo para o patossistema cana-carvão

Das espécies de plantas conhecidas, *Arabidopsis thaliana* é, com ampla margem, a mais estudada. Somente em 2022, mais de 5500 artigos científicos sobre *Arabidopsis* foram adicionados ao PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Essa planta foi originalmente adotada como organismo modelo por conta da sua aplicabilidade em experimentos genéticos. Dentre as características que tornam a *Arabidopsis* tão interessante estão o curto período geracional, produção massiva de sementes através de autopolinização e seu pequeno porte (Koornneef and Meinke, 2010).

Devido à facilidade de se trabalhar com esse organismo, *Arabidopsis* foi a primeira planta e o terceiro eucarioto (após *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*) a ter seu genoma sequenciado (Bevan and Walsh, 2005). No estudo de interações patógeno-hospedeiro, essa espécie se mostra um modelo capaz de elucidar diversos aspectos das infecções de plantas por microrganismos. Na década de 1990, alguns dos primeiros genes de resistência a doença clonados foram de *Arabidopsis*, como RPS2 e RPM1, proteínas capazes de reconhecer efetores intracelulares de *Pseudomonas syringae* (Bent et al., 1994; Grant et al., 1995).

Em relação a estudos sobre o carvão, foi demonstrado que o fungo *Ustilago maydis*, o patógeno responsável pelo carvão do milho, é capaz de infectar *Arabidopsis* sob condições experimentais, revelando-se um sistema útil para estudar a patogenicidade do fungo cuja expressão de fatores de transcrição, como o TUP1 e NIT2, foi alterada durante a infecção por *U. maydis* (Méndez-Morán et al., 2005). Também há relatos com o fungo *Ustilaginoidea virens*, responsável pelo “falso carvão” de arroz, com a planta modelo (Andargie and Li, 2016). Tal estudo revelou que, apesar de apresentar sinais fenotípicos diferentes em arroz e *Arabidopsis*,

a doença gera sintomas similares como esterilidade das flores e repressão da expressão de alguns genes de defesa.

No grupo “Genomics” a *Arabidopsis* já foi utilizada como modelo para se estudar o patossistema do carvão-da-cana. Um projeto avaliando a infecção de *Arabidopsis* por *S. scitamineum* mostrou que o fungo é capaz de infectar a planta modelo, desenvolve estruturas típicas como apressório e hifas, e ainda pode germinar teliósporos. Análises sobre a expressão gênica das plantas evidenciaram que o patógeno altera a expressão de genes relacionados à resposta contra carvão (Silva, 2020). Um estudo sobre interação proteína-proteína sugere que g5159 do fungo é capaz de interagir e reter a localização subcelular do fator de transcrição SPL13, que é relacionado à regulação do desenvolvimento de estruturas florais de *Arabidopsis* (Mendes, 2022).

5. Detecção de interações proteína-proteína

Nas plantas, a maioria dos processos fisiológicos é regulada por vias complexas de transdução de sinal que determinam o desenvolvimento, diferenciação e resposta ao ambiente (Struk et al., 2019). A identificação e caracterização de interações proteína-proteína fornecem informações cruciais para a compreensão dos mecanismos moleculares relacionados aos diversos tipos de processos biológicos. Mesmo com o desenvolvimento de vários métodos para a detecção dessas interações, tais métodos geralmente operam em condições não ideais ou em sistemas não vegetais (Schütze et al., 2009).

As células apresentam diversos eventos de interação proteína-proteína (PPI) que são essenciais ao seu funcionamento. Interações constitutivas são estáveis e estão presentes continuamente na célula, parte delas formam complexos que realizam funções estruturais, enquanto outra parte lida com funções como replicação, transcrição e tradução. Tais interações são geralmente fáceis de serem detectadas (Morsy et al., 2008). As interações reguladoras, por outro lado, ocorrem apenas em determinados contextos, para regular o desenvolvimento ou respostas a condições ambientais específicas. As proteínas desse tipo normalmente fazem parte de cascatas de sinalização, cuja interação é temporária e sensível a outras moléculas (Syafrizayanti et al., 2014).

Inúmeras técnicas estão disponíveis para detectar e comprovar as interações, tanto *in vivo* quanto *in vitro*; cada uma delas conta com características que fornecem informações sobre a localização, tempo e dinâmica das proteínas durante os processos celulares (Struk et al., 2019). Algumas das maneiras de se detectar interação proteína-proteína usam extratos de células ou proteínas purificadas, como estudos estruturais de co-cristalização, co-imunoprecipitação e

“far-western” blot. Outras metodologias usam a maquinaria celular para investigar as interações, como o sistema de duplo-híbrido em leveduras (Y2H) (Lee and Gelvin, 2014). Existe também a abordagem computacional, capaz de detectar inúmeras redes de interação nos mais diversos sistemas (Kodama and Hu, 2012). Porém, somente a combinação de vários desses métodos pode fornecer uma visão confiável e aprofundada sobre a ação dessas proteínas.

O Y2H foi um dos primeiros ensaios de PPI desenvolvidos, sendo profusamente difundido na pesquisa em plantas (Fields and Song, 1989). Neste sistema, a interação entre duas proteínas é avaliada com base na ativação transcricional de um gene repórter que permite o crescimento em meios seletivos ou sua detecção por uma reação enzimática de cor. No Y2H clássico, o cDNA que codifica a proteína de interesse denominada *bait* é clonada em um vetor contendo o domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição GAL4. Em outro vetor é clonado o cDNA que codifica a proteína denominada *prey* junto ao domínio de ativação do mesmo fator de transcrição. Se a interação ocorre, há a reconstrução do GAL4 que é seguida pela indução do gene repórter (Paiano et al., 2019).

Embora essa metodologia seja limitada à análise de pares de proteínas, ela pode ser facilmente automatizada para triagem de bibliotecas de cDNA. Com isso, é possível identificar dezenas de novas interações. Nesta configuração, o gene da proteína *bait* fundido ao domínio de ligação é usado para pesquisar a biblioteca com supostas *preys* fundidas ao domínio de ativação. Uma vez que a interação ocorre, a ativação transcricional do gene repórter amplifica o sinal de interação, garantindo uma alta sensibilidade ao método, tornando o sistema Y2H vantajoso para elucidar interações fracas e transitórias (Brückner et al., 2009).

Uma outra maneira de se detectar interações proteína-proteína é a co-imunoprecipitação (CoIP). A CoIP pode ser realizado em uma única etapa ou como parte de uma purificação em tandem para se detectar diversas interações. Nessa metodologia, um anticorpo específico para uma proteína alvo conhecida é ligado a um grânulo e incubado para extrair a proteína alvo da solução junto com outras proteínas complexadas a ela. O anticorpo pode ser usado para reconhecer a própria proteína de interesse ou então um marcador que foi geneticamente fundido a ela. Após o ensaio, os peptídeos complexados à proteína de interesse podem ser detectados por espectrometria de massas (Kaboord and Perr, 2008).

A principal vantagem de usar um anticorpo contra a proteína de interesse é que a proteína não precisa ser expressa em um sistema heterólogo, como no Y2H. Suas desvantagens são principalmente práticas: é necessário sintetizar e/ou purificar o peptídeo, imunizar os animais com a proteína de interesse e colher os anticorpos. Esses anticorpos policlonais são limitados e exclusivos para cada animal imunizado. Além disso, não se pode ter certeza de que os

anticorpos serão específicos o suficiente para a detecção (Moresco et al., 2010). Sendo assim, os ensaios de detecção de PPI precisam ser posteriormente validados por outras metodologias.

6. Predição de estruturas de proteínas e complexos com o AlphaFold2

O AlphaFold2 (como foi chamado para se diferenciar de sua versão prévia) é um modelo de aprendizado de máquina desenvolvido pela DeepMind (<https://www.deepmind.com/>) capaz de prever as estruturas tridimensionais de proteínas a partir de suas sequências de aminoácidos. A rede neural do AlphaFold2 combina a análise de padrões homólogos com o alinhamento de sequências múltiplas para gerar a estrutura prevista. Quando apresentado no CASP14 (*Critical Assessment of methods of protein Structure Prediction*, 14th round), um estudo cego que avalia as técnicas de previsão da estrutura da proteína, esse algoritmo mostrou uma precisão inédita na previsão da estrutura tridimensional de proteínas (Jumper et al., 2021). O AlphaFold2 foi capaz de prever as coordenadas atômicas 3D de estruturas de proteínas dobradas em uma pontuação de teste de distância global (GDT_TS) de 92,4% (Kryshtafovych et al., 2021).

O algoritmo do AlphaFold2 funciona em três partes, e está esquematizado na Figura 02. Primeiramente, ele usa a sequência de aminoácidos para consultar vários bancos de dados de sequências de proteínas (como o *Protein Data Bank*) e constrói um alinhamento de sequência múltipla (MSA). O algoritmo também tenta identificar proteínas modelos que possam ter uma estrutura semelhante à entrada e constrói um *MSA representation*. Ele também gera uma representação inicial da estrutura chamada *pair representation*. Na segunda parte, o AlphaFold2 submete o *MSA representation* e o *pair representation* ao módulo transformador Evoformer. Esse módulo refina esses dois conjuntos de dados trocando informações iterativamente entre eles. O resultado é uma lista de coordenadas cartesianas representando a posição de cada átomo da proteína, incluindo as cadeias laterais. Este processo é organizado em blocos que se repetem iterativamente até um determinado número de ciclos. Essa é a primeira grande diferença do AlphaFold2 em relação a outros modelos de predição estrutural de proteínas usando redes neurais. Enquanto em outros algoritmos a coordenada dos átomos é o produto final da rede, no AlphaFold2 ela é tanto o produto quanto uma camada intermediária, sendo refinada iterativamente. A cada ciclo, o modelo usa a hipótese estrutural atual para melhorar a avaliação da *MSA representation* e da *pair representation*, que por sua vez leva a uma nova hipótese estrutural. Na terceira etapa os resultados gerados pelo Evoformer passam por uma outra rede neural que irão gerar as coordenadas da estrutura final. Finalmente, depois de gerar uma estrutura final, ele passa todas as informações (ou seja, *MSA representation*, *pair representation* e estrutura prevista) de volta para a entrada do Evoformer. Esse processo de reciclagem é outra

diferença importante em relação aos demais algoritmos e leva a um refinamento da predição (Jumper et al., 2021; Skolnick et al., 2021; Nussinov et al., 2022).

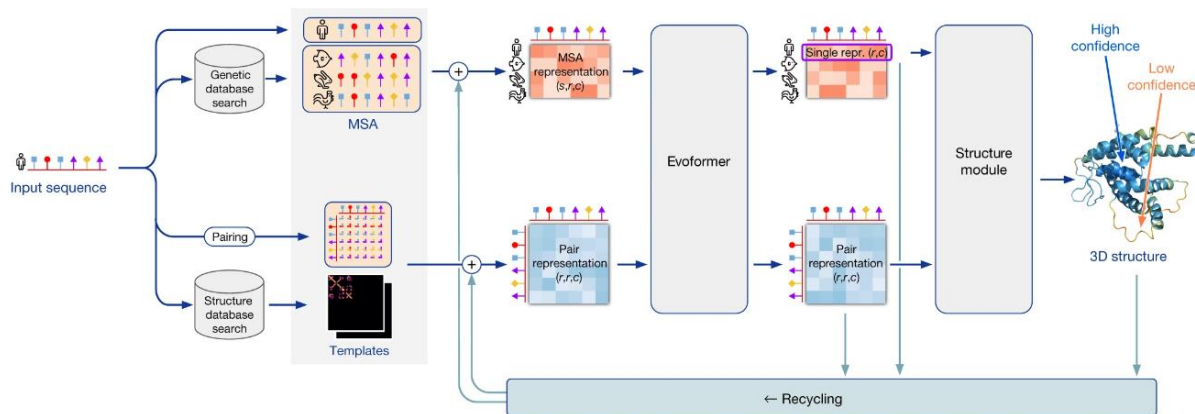


Figura 2. Modelo da arquitetura do algoritmo do AlphaFold2. As setas mostram o fluxo de informações entre as três etapas descritas. Adaptada de: (Jumper et al., 2021)

O AlphaFold2 tem como saída três conjuntos principais de dados: as coordenadas tridimensionais de cada átomo no plano cartesiano; o Teste de Diferença de Distância Local previsto (pLDDT); e o Erro de Alinhamento Previsto (PAE). Resíduos com valores de pLDDT < 50 tem baixa confiabilidade, revelando também possíveis regiões de desordem. Valores de pLDDT entre 50 e 70 indicam que o posicionamento do resíduo pode apresentar erros, mas que fornece informações confiáveis sobre a estrutura. Resíduos com pLDDT entre 70 e 90 apresentam baixos desvios da estrutura experimental, e com pLDDT > 90 tem a predição tão boa quanto um modelo experimental. O PAE indica o erro posicional esperado em determinado resíduo x se as estruturas previstas forem alinhadas ao resíduo y (usando os átomos $C\alpha$, N e C). Esses valores são usados para avaliar a confiança na posição relativa e orientação de diferentes partes do modelo, como, por exemplo, dois domínios (Varadi et al., 2022).

Através de uma página web do Instituto Europeu de Bioinformática (<http://alphafold.ebi.ac.uk>) é possível acessar previsões de estruturas de proteínas feitas usando AlphaFold2. Nele é possível encontrar modelos detalhados de estruturas de proteínas do proteoma humano que antes eram desconhecidos. Atualmente, o uso do AlphaFold2 foi estendido para além da predição de uma única proteína. Um trabalho de 2021 mostrou ser possível usar o algoritmo para modelar as estruturas de complexos proteicos após concatenar as sequências dos peptídeos usando uma sequência de poliglicina (Ko and Lee, 2021). Posteriormente, pesquisadores da própria DeepMind desenvolveram o AlphaFold-Multimer, uma versão treinada com proteínas multiméricas conhecidas, capaz de prever a estrutura de

complexos com mais acurácia que a versão original com as adaptações mencionadas (Evans et al., 2022). Há também uma versão simplificada do AlphaFold2 e AlphaFold-Multimer disponível no Google Colaboratory chamada ColabFold (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>). Ela é capaz de prever a estrutura de proteínas, homo e heterocomplexos com qualidade comparada ao executar o algoritmo localmente (Mirdita et al., 2022).

A predição pelo AlphaFold2 já está sendo utilizada por diversos grupos de pesquisa para auxiliar na elaboração de hipóteses sobre as propriedades e evolução de proteínas. Um artigo sobre a evolução de vírus do domínio *Duplodnaviria* avaliou as relações evolutivas de duas proteínas virais conservadas, a principal proteína do capsídeo e uma terminase. A análise das estruturas obtidas pelo AlphaFold2 em conjunto com as informações filogenéticas das sequências das proteínas virais mostrou ser uma abordagem efetiva para traçar as relações evolutivas entre vírus distantes. Além disso, o AlphaFold2 apresentou uma precisão maior em relação ao RoseTTAFold (Evseev et al., 2023). Um outro trabalho usou o AlphaFold-Multimer para avaliar 1.879 proteínas secretadas de sete patógenos de tomate em relação a sua capacidade de interagir com seis hidrolases da planta relacionadas à sua resposta de defesa. A triagem identificou 15 proteínas que tem o potencial de obstruir o sítio ativo de quitinases e proteases (Homma et al., 2023).

7. Validação das interações proteína-proteína com BiFC

Quando uma possível interação proteína-proteína é detectada computacionalmente ou através de técnicas como Y2H ou co-immunoprecipitação, a mesma precisa ser validada por outro método. Metodologias comuns para validar interações regulatórias e de baixa afinidade são os ensaios de complementação de fragmentos (Struk et al., 2019). Nesse contexto, o ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC) é utilizado frequentemente para estudar o efeito dos efetores microbianos em proteínas de plantas (Lee e Gelvin, 2014).

BiFC é um ensaio de complementação de peptídeos no qual fragmentos de proteínas fluorescentes, que não apresentam fluorescência sozinhos, são unidos de maneira que sua fluorescência é restaurada (Lee e Gelvin, 2014). Na prática, duas proteínas de interesse, cuja interação precisa ser validada, são fusionadas com a porção N-terminal e C-terminal de uma proteína fluorescente. Caso a interação aconteça, os dois fragmentos são colocados em justaposição e retomam sua fluorescência (Walter et al., 2004).

Essa técnica foi utilizada primeiramente em *E. coli*, na qual a GFP pôde ser reconstituída quando seus fragmentos foram fundidos a peptídeos cuja interação já era compreendida (Ghosh

et al., 2000). Tal complexo se mostrou solúvel e estável, apresentando baixa taxa de dissociação. O primeiro uso de BiFC em células eucarióticas foi realizado por Nagai et al., (2001) para estudar a interação entre calmodulina e seu peptídeo alvo. Subsequentemente, vários sistemas BiFC foram desenvolvidos, incluindo aqueles utilizados em plantas (Bracha-Drori et al., 2004).

O ensaio BiFC tem diversas vantagens no estudo de patossistemas: a técnica não necessita de equipamentos caros e sofisticados; existe pouco ruído na interpretação dos dados; é possível determinar a localização subcelular dos complexos de interação; a estabilidade da proteína fluorescente reconstituída dá sensibilidade ao método, permitindo a detecção de interações transientes (Ohad et al., 2007). Todavia, devido à forte afinidade entre os fragmentos da GFP, a reconstituição da fluorescência pode ocorrer sem a interação entre os dois peptídeos de interesse, levando a falsos positivos (Struk et al., 2019). Outro empecilho da técnica é a lenta maturação do fluoróforo reconstituído, resultando em falsos negativos (Ohad et al., 2007).

As desvantagens dos ensaios BiFC podem ser superadas aplicando os controles negativos e positivos apropriados. O melhor controle negativo é incluir em cada vetor um peptídeo com um sítio de interação com uma mutação, ou simplesmente deletado. Isso garante que a fluorescência observada na microscopia vem da interação entre as duas proteínas de interesse, e não da afinidade entre os fragmentos do fluoróforo. Quando tal peptídeo mutado não está disponível, outra proteína com estrutura similar pode ser usada como controle negativo. Como controles positivos pode-se clonar nos mesmos vetores peptídeos cuja interação já é reconhecida (Waadt and Kudla, 2008; Kudla and Bock, 2016).

Referências

- Amalraj, V. A., and Balasundaram, N. (2006). On the Taxonomy of the Members of 'Saccharum Complex.' *Genet Resour Crop Evol* 53, 35–41. doi: 10.1007/s10722-004-0581-1.
- Andargie, M., and Li, J. (2016). Arabidopsis thaliana: A Model Host Plant to Study Plant–Pathogen Interaction Using Rice False Smut Isolates of *Ustilaginoidea virens*. *Front Plant Sci* 7. doi: 10.3389/fpls.2016.00192.
- Bent, A. F., Kunkel, B. N., Dahlbeck, D., Brown, K. L., Schmidt, R., Giraudat, J., et al. (1994). RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a Leucine-Rich Repeat Class of Plant Disease Resistance Genes. *Science* (1979) 265, 1856–1860. doi: 10.1126/science.8091210.
- Bevan, M., and Walsh, S. (2005). The *Arabidopsis* genome: A foundation for plant research. *Genome Res* 15, 1632–1642. doi: 10.1101/gr.3723405.

- Bhuiyan, S. A., Magarey, R. C., McNeil, M. D., and Aitken, K. S. (2021). Sugarcane Smut, Caused by *Sporisorium scitamineum*, a Major Disease of Sugarcane: A Contemporary Review. *Phytopathology* 111, 1905–1917. doi: 10.1094/PHYTO-05-21-0221-RVW.
- Bracha-Drori, K., Shichrur, K., Katz, A., Oliva, M., Angelovici, R., Yalovsky, S., et al. (2004). Detection of protein–protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant Journal* 40, 419–427. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02206.x.
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., and Schlattner, U. (2009). Yeast Two-Hybrid, a Powerful Tool for Systems Biology. *Int J Mol Sci* 10, 2763–2788. doi: 10.3390/ijms10062763.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2022). Acompanhamento da safra brasileira. 8.
- Croft, B., Magarey, R., and Whittle, P. (2000). “Disease Management,” in *Manual of canegrowing* (BSES), 263–289.
- Cursi, D. E., Hoffmann, H. P., Barbosa, G. V. S., Bressiani, J. A., Gazaffi, R., Chapola, R. G., et al. (2022). History and Current Status of Sugarcane Breeding, Germplasm Development and Molecular Genetics in Brazil. *Sugar Tech* 24, 112–133. doi: 10.1007/s12355-021-00951-1.
- D’Hont, A., Grivet, L., Feldmann, P., Glaszmann, J. C., Rao, S., and Berding, N. (1996). Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Mol Gen Genet* 250, 405–413. doi: 10.1007/BF02174028.
- Dodds, P. N., and Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11, 539–548. doi: 10.1038/nrg2812.
- Doehlemann, G., Schipper, K., and Kahmann, R. (2011). “The Effectors of Smut Fungi,” in *Effectors in Plant–Microbe Interactions* (Wiley), 77–99. doi: 10.1002/9781119949138.ch4.
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Aßmann, D., Schwambach, D., Hof, A., Mohanty, A., et al. (2009). Pep1, a Secreted Effector Protein of *Ustilago maydis*, Is Required for Successful Invasion of Plant Cells. *PLoS Pathog* 5, e1000290. doi: 10.1371/journal.ppat.1000290.
- Evans, R., O’Neil, M., Pritzel, A., Antropova, N., Senior, A., Green, T., et al. (2022). Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer. *bioRxiv*. doi: https://doi.org/10.1101/2021.10.04.463034.
- Evseev, P., Gutnik, D., Shneider, M., and Miroshnikov, K. (2023). Use of an Integrated Approach Involving AlphaFold Predictions for the Evolutionary Taxonomy of *Duplodnaviria* Viruses. *Biomolecules* 13, 110. doi: 10.3390/biom13010110.
- FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations (2020). FAOSTAT.

- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature* 340, 245–246. doi: 10.1038/340245a0.
- Ghosh, I., Hamilton, A. D., and Regan, L. (2000). Antiparallel Leucine Zipper-Directed Protein Reassembly: Application to the Green Fluorescent Protein. *J Am Chem Soc* 122, 5658–5659. doi: 10.1021/ja994421w.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43, 205–227. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923.
- Grant, M. R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., et al. (1995). Structure of the Arabidopsis RPM1 Gene Enabling Dual Specificity Disease Resistance. *Science (1979)* 269, 843–846. doi: 10.1126/science.7638602.
- Grivet, L., and Arruda, P. (2002). Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Curr Opin Plant Biol* 5, 122–127. doi: 10.1016/S1369-5266(02)00234-0.
- Hayafune, M., Berisio, R., Marchetti, R., Silipo, A., Kayama, M., Desaki, Y., et al. (2014). Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111. doi: 10.1073/pnas.1312099111.
- Henry, R. J. (2010). “Basic Information on the Sugarcane Plant,” in *Genetics, Genomics and Breeding of Sugarcane*, eds. R. J. Henry and C. Kole (Science Publisher), 1–8.
- Hidayah, N., McNeil, M., Li, J., Bhuiyan, S., Galea, V., and Aitken, K. (2021). Resistance mechanisms and expression of disease resistance-related genes in sugarcane (*Saccharum officinarum*) to *Sporisorium scitamineum* infection. *Functional Plant Biology* 48, 1302. doi: 10.1071/FP21122.
- Homma, F., Huang, J., and van der Hoorn, R. (2023). Alphafold-multimer predicts cross-kingdom interactions at the plant-pathogen interface. *bioRxiv*. doi: 10.1101/2023.04.03.535425
- Horst, R. K. (2013). “Smuts,” in *Westcott’s Plant Disease Handbook* (Dordrecht: Springer Netherlands), 373–379. doi: 10.1007/978-94-007-2141-8_46.
- Jaswal, R., Kiran, K., Rajarammohan, S., Dubey, H., Singh, P. K., Sharma, Y., et al. (2020). Effector Biology of Biotrophic Plant Fungal Pathogens: Current Advances and Future Prospects. *Microbiol Res* 241, 126567. doi: 10.1016/j.micres.2020.126567.
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. doi: 10.1038/nature05286.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.
- Kaboord, B., and Perr, M. (2008). “Isolation of Proteins and Protein Complexes by Immunoprecipitation,” in, 349–364. doi: 10.1007/978-1-60327-064-9_27.

- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., et al. (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 11086–11091. doi: 10.1073/pnas.0508882103.
- Ko, J., and Lee, J. (2021). Can AlphaFold2 predict protein-peptide complex structures accurately? *bioRxiv*. 10.1101/2021.07.27.453972
- Kodama, Y., and Hu, C.-D. (2012). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): A 5-year update and future perspectives. *Biotechniques* 53, 285–298. doi: 10.2144/000113943.
- Koornneef, M., and Meinke, D. (2010). The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant Journal* 61, 909–921. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.04086.x.
- Kryshtafovych, A., Schwede, T., Topf, M., Fidelis, K., and Moulton, J. (2021). Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP) - Round XIV. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 89, 1607–1617. doi: 10.1002/prot.26237.
- Kudla, J., and Bock, R. (2016). Lighting the Way to Protein-Protein Interactions: Recommendations on Best Practices for Bimolecular Fluorescence Complementation Analyses. *Plant Cell* 28, 1002–1008. doi: 10.1105/tpc.16.00043.
- Lee, L.-Y., and Gelvin, S. (2014). “Bimolecular Fluorescence Complementation for Imaging Protein Interactions in Plant Hosts of Microbial Pathogens,” in *Host-Bacteria Interactions: Methods and protocols*, eds. A. Vergunst and D. O’Callaghan (Humana Press).
- Lu, S., Wang, Y., Shen, X., Guo, F., Zhou, C., Li, R., et al. (2021). SsPEP1, an Effector with Essential Cellular Functions in Sugarcane Smut Fungus. *Journal of Fungi* 7, 954. doi: 10.3390/jof7110954.
- Maia, T., Rody, H. V. S., Bombardelli, R. G. H., Souto, T. G., Camargo, L. E. A., and Monteiro-Vitorello, C. B. (2022). A Bacterial Type Three Secretion-Based Delivery System for Functional Characterization of *Sporisorium scitamineum* Plant Immune Suppressing Effector Proteins. *Phytopathology* 112, 1513–1523. doi: 10.1094/PHYTO-08-21-0326-R.
- Mansoor, S., Aslamkhan, M., Khan, N. A., and Nasir, I. R. (2016). Effect of Whip Smut Disease on the Quantitative and Qualitative Parameters of Sugarcane Varieties/Lines. *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal* 2. doi: 10.19080/ARTOAJ.2016.02.555588.
- Marques, J. P. R., Appezzato-da-Glória, B., Piepenbring, M., Massola, N. S., Monteiro-Vitorello, C. B., and Vieira, M. L. C. (2016). Sugarcane smut: shedding light on the development of the whip-shaped sorus. *Ann Bot*, mcw169. doi: 10.1093/aob/mcw169.
- McNeil, M. D., Bhuiyan, S. A., Berkman, P. J., Croft, B. J., and Aitken, K. S. (2018). Analysis of the resistance mechanisms in sugarcane during *Sporisorium scitamineum* infection using RNA-seq and microscopy. *PLoS One* 13, e0197840. doi: 10.1371/journal.pone.0197840.
- Mendes, J. F. (2022). Protein-protein interaction between a candidate effector of *S. scitamineum* and a transcription factor of *A. thaliana* to study the smut-sugarcane pathosystem. doi: 10.11606/D.11.2022.tde-11042022-152208.

- Méndez-Morán, L., Reynaga-Peña, C. G., Springer, P. S., and Ruiz-Herrera, J. (2005). Ustilago maydis Infection of the Nonnatural Host *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology* 95, 480–488. doi: 10.1094/PHYTO-95-0480.
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., and Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods* 19, 679–682. doi: 10.1038/s41592-022-01488-1.
- Moore, P. H., Andrew, P. H., and Tew, T. (2014). “Sugarcane: The Crop, the Plant, and Domestication,” in *Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology*, eds. P. H. Moore and F. Botha (John Wiley & Sons), 1–17.
- Moore, P. H., Paterson H., A., and Tew, T. (2013). *Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology*. eds. P. H. Moore and F. C. Botha Wiley doi: 10.1002/9781118771280.
- Moresco, J. J., Carvalho, P. C., and Yates, J. R. (2010). Identifying components of protein complexes in *C. elegans* using co-immunoprecipitation and mass spectrometry. *J Proteomics* 73, 2198–2204. doi: 10.1016/j.jprot.2010.05.008.
- Morsy, M., Gouthu, S., Orchard, S., Thorneycroft, D., Harper, J. F., Mittler, R., et al. (2008). Charting plant interactomes: possibilities and challenges. *Trends Plant Sci* 13, 183–191. doi: 10.1016/j.tplants.2008.01.006.
- Nagai, T., Sawano, A., Park, E. S., and Miyawaki, A. (2001). Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca^{2+} . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 3197–3202. doi: 10.1073/pnas.051636098.
- Ngou, B. P. M., Ahn, H.-K., Ding, P., and Jones, J. D. G. (2021). Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature* 592, 110–115. doi: 10.1038/s41586-021-03315-7.
- Nussinov, R., Zhang, M., Liu, Y., and Jang, H. (2022). AlphaFold, Artificial Intelligence (AI), and Allostery. *J Phys Chem B* 126, 6372–6383. doi: 10.1021/acs.jpcc.2c04346.
- Ohad, N., Shichrur, K., and Yalovsky, S. (2007). The Analysis of Protein-Protein Interactions in Plants by Bimolecular Fluorescence Complementation. *Plant Physiol* 145, 1090–1099. doi: 10.1104/pp.107.107284.
- Paiano, A., Margiotta, A., De Luca, M., and Bucci, C. (2019). Yeast Two-Hybrid Assay to Identify Interacting Proteins. *Curr Protoc Protein Sci* 95, e70. doi: 10.1002/cpps.70.
- Peters, L. P., Teixeira-Silva, N. S., Bini, A. P., Silva, M. M. L., Moraes, N., Crestana, G. S., et al. (2020). Differential responses of genes and enzymes associated with ROS protective responses in the sugarcane smut fungus. *Fungal Biol* 124, 1039–1051. doi: 10.1016/j.funbio.2020.09.009.
- Pompidor, N., Charron, C., Hervouet, C., Bocs, S., Droc, G., Rivallan, R., et al. (2021). Three founding ancestral genomes involved in the origin of sugarcane. *Ann Bot* 127, 827–840. doi: 10.1093/aob/mcab008.

- Que, Y., Xu, L., Wu, Q., Liu, Y., Ling, H., Liu, Y., et al. (2014). Genome sequencing of *Sporisorium scitamineum* provides insights into the pathogenic mechanisms of sugarcane smut. *BMC Genomics* 15, 996. doi: 10.1186/1471-2164-15-996.
- Rajput, M. A., Rajput, N. A., Syed, R. N., Lodhi, A. M., and Que, Y. (2021). Sugarcane Smut: Current Knowledge and the Way Forward for Management. *Journal of Fungi* 7, 1095. doi: 10.3390/jof7121095.
- Rocafort, M., Fudal, I., and Mesarich, C. H. (2020). Apoplastic effector proteins of plant-associated fungi and oomycetes. *Curr Opin Plant Biol* 56, 9–19. doi: 10.1016/j.pbi.2020.02.004.
- Sánchez-Vallet, A., Mesters, J. R., and Thomma, B. P. H. J. (2015). The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol Rev* 39, 171–183. doi: 10.1093/femsre/fuu003.
- Sathe, T. V., Shinde, K. P., Shaikh, A. L., and Raut, D. K. (2009). “Sugarcane diseases,” in *Sugarcane pests and diseases* (Manglam Publications), 100–159.
- Schaker, P. D. C., Palhares, A. C., Taniguti, L. M., Peters, L. P., Creste, S., Aitken, K. S., et al. (2016). RNAseq Transcriptional Profiling following Whip Development in Sugarcane Smut Disease. *PLoS One* 11, e0162237. doi: 10.1371/journal.pone.0162237.
- Schütze, K., Herter, K., and Chaban, C. (2009). “Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) to Study Protein–Protein Interactions in Living Plant Cells,” in *Plant Signal Transduction: Methods and Protocols*, ed. T. Pfannschmidt (Humana Press), 189–201.
- Selin, C., de Kievit, T. R., Belmonte, M. F., and Fernando, W. G. D. (2016). Elucidating the Role of Effectors in Plant-Fungal Interactions: Progress and Challenges. *Front Microbiol* 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00600.
- Silva, M. M. L. da (2020). *Arabidopsis thaliana* as a model plant for the study of plant-pathogen interaction between *Sporisorium scitamineum* and sugarcane. doi: 10.11606/D.11.2020.tde-05052020-091925.
- Singh, N., Somai, B. M., and Pillay, D. (2004). Smut disease assessment by PCR and microscopy in inoculated tissue cultured sugarcane cultivars. *Plant Science* 167, 987–994. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.05.006.
- Skolnick, J., Gao, M., Zhou, H., and Singh, S. (2021). AlphaFold 2: Why It Works and Its Implications for Understanding the Relationships of Protein Sequence, Structure, and Function. *J Chem Inf Model* 61, 4827–4831. doi: 10.1021/acs.jcim.1c01114.
- Struk, S., Jacobs, A., Sánchez Martín-Fontecha, E., Gevaert, K., Cubas, P., and Goormachtig, S. (2019). Exploring the protein-protein interaction landscape in plants. *Plant Cell Environ* 42, 387–409. doi: 10.1111/pce.13433.
- Su, Y., Xu, L., Fu, Z., Yang, Y., Guo, J., Wang, S., et al. (2014). ScChi, Encoding an Acidic Class III Chitinase of Sugarcane, Confers Positive Responses to Biotic and Abiotic Stresses in Sugarcane. *Int J Mol Sci* 15, 2738–2760. doi: 10.3390/ijms15022738.

- Su, Y., Xu, L., Wang, Z., Peng, Q., Yang, Y., Chen, Y., et al. (2016). Comparative proteomics reveals that central metabolism changes are associated with resistance against *Sporisorium scitamineum* in sugarcane. *BMC Genomics* 17, 800. doi: 10.1186/s12864-016-3146-8.
- Sundar, R. A., Barnabas, L. E., Malathi, P., and Viswanathan, R. (2012). “A Mini-Review on Smut Disease of Sugarcane Caused by *Sporisorium scitamineum*,” in *Botany*, ed. J. K. Mworio, 107–128.
- Syafrizayanti, Betzen, C., Hoheisel, J. D., and Kastelic, D. (2014). Methods for analyzing and quantifying protein–protein interaction. *Expert Rev Proteomics* 11, 107–120. doi: 10.1586/14789450.2014.875857.
- Taniguti, L. M., Schaker, P. D. C., Benevenuto, J., Peters, L. P., Carvalho, G., Palhares, A., et al. (2015). Complete Genome Sequence of *Sporisorium scitamineum* and Biotrophic Interaction Transcriptome with Sugarcane. *PLoS One* 10, e0129318. doi: 10.1371/journal.pone.0129318.
- Teixeira-Silva, N. S., Schaker, P. D. C., Rody, H. V. S., Maia, T., Garner, C. M., Gassmann, W., et al. (2020). Leaping into the Unknown World of *Sporisorium scitamineum* Candidate Effectors. *Journal of Fungi* 6, 339. doi: 10.3390/jof6040339.
- Tew, T. L., and Cobill, R. M. (2008). “Genetic Improvement of Sugarcane (*Saccharum* spp.) as an Energy Crop,” in *Genetic Improvement of Bioenergy Crops* (New York, NY: Springer New York), 273–294. doi: 10.1007/978-0-387-70805-8_9.
- Tucker, S. L., and Talbot, N. J. (2001). Surface attachment and penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* 39, 385–417. doi: 10.1146/annurev.phyto.39.1.385.
- Vaghela, B., Vashi, R., Rajput, K., and Joshi, R. (2022). Plant chitinases and their role in plant defense: A comprehensive review. *Enzyme Microb Technol* 159, 110055. doi: 10.1016/j.enzmictec.2022.110055.
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., et al. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res* 50, D439–D444. doi: 10.1093/nar/gkab1061.
- Waadt, R., and Kudla, J. (2008). In Planta Visualization of Protein Interactions Using Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC). *Cold Spring Harb Protoc* 2008. doi: 10.1101/pdb.prot4995.
- Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C., et al. (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant Journal* 40, 428–438. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02219.x.
- Yan, M., Zhu, G., Lin, S., Xian, X., Chang, C., Xi, P., et al. (2016). The mating-type locus b of the sugarcane smut *Sporisorium scitamineum* is essential for mating, filamentous growth and pathogenicity. *Fungal Genetics and Biology* 86, 1–8. doi: 10.1016/j.fgb.2015.11.005.

Zuo, W., Ökmen, B., Depotter, J. R. L., Ebert, M. K., Redkar, A., Misas Villamil, J., et al. (2019). Molecular Interactions Between Smut Fungi and Their Host Plants. *Annu Rev Phytopathol* 57, 411–430. doi: 10.1146/annurev-phyto-082718-100139.

2. ANÁLISE DA VARIABILIDADE E PERFIL DE EXPRESSÃO DAS QUITINASES DE CANA-DE-AÇÚCAR DURANTE A INFECCÃO POR *Sporisorium scitamineum*

Resumo

A quitina é um biopolímero de alta abundância na natureza e está presente na estrutura de vários fitopatógenos como fungos e nematoides. As quitinases são um subgrupo de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e têm como principal função catalisar a hidrólise da quitina. Vários estudos indicam que essas enzimas desempenham um papel fundamental na defesa da planta contra os patógenos e, portanto, são bons alvos para estudos de resposta de defesa. Este trabalho apresenta uma análise da variabilidade e perfil de expressão da família de genes quitinases de cana-de-açúcar para identificar seu papel na defesa contra o carvão-da-cana (*Sporisorium scitamineum*). Para tal, foram realizadas análises integradas de bioinformática de transcritos presentes em um banco de transcriptoma montados *de novo*, buscando identificar as diferenças e semelhanças entre suas estruturas e sequências. Subsequentemente, foi investigado o perfil de expressão desses transcritos durante a infecção por *Sporisorium scitamineum* em duas variedades diferentes (SP80-3280 e IAC 6-66). A busca por domínios GH18/19 identificou 16 transcritos putativos que se dividem filogeneticamente em duas famílias com domínios glicosil-hidrolase (GH) diferentes – GH18 e GH19, que por sua vez se subdividem em outras cinco classes (I-V) com base em sua estrutura e similaridade. Também foi encontrado um transcrito com domínio Barwin com possível ação quitinásica. A análise dos resíduos catalíticos das quitinases GH18/19 encontrou que seis deles não apresentam o glutamato responsável pela doação de prótons durante a hidrólise da quitina. Foi realizada também a previsão estrutura tridimensional de seis quitinases através do AlphaFold2. Essa previsão revelou que os domínios GH18 apresentam uma estrutura tim-barril e os domínios GH19 são ricos em alfa-hélices com um sulco, características típicas das respectivas famílias. Em seguida, uma quitinase de classe I foi escolhida para uma simulação de interação com o candidato a efetor (CE) g5159 usando o AlphaFold-Multimer. Nessa simulação foi observado que o CE provavelmente apresenta dois domínios de desordem intrínseca e que um deles participa da interação. De acordo com a previsão do AlphaFold, o CE age estabelecendo ligações secundárias com as alças do domínio GH19, obstruindo o sulco catalítico. Finalmente, a análise da expressão dessas proteínas em plantas infectadas mostrou que há uma modulação do perfil transcricional das quitinases de cana pelo fungo.

Palavras-chave: AlphaFold, Carvão-da-cana, Interação planta-patógeno, Interação proteína-proteína, RNA-seq

Referências

- Baillieux, F., Genetet, I., Kopp, M., Saindrenan, P., Fritig, B., & Kauffmann, S. (1995). A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: a fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defence genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance. *The Plant Journal*, *8*(4), 551–560. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.8040551.x>
- Baranski, R., Klocke, E., & Nothnagel, T. (2008). Chitinase CHIT36 from *Trichoderma harzianum* Enhances Resistance of Transgenic Carrot to Fungal Pathogens. *Journal of Phytopathology*, *156*(9), 513–521. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2008.01417.x>
- Bartholomew, E. S., Black, K., Feng, Z., Liu, W., Shan, N., Zhang, X., Wu, L., Bailey, L., Zhu, N., Qi, C., Ren, H., & Liu, X. (2019). Comprehensive Analysis of the Chitinase Gene Family in Cucumber (*Cucumis sativus* L.): From Gene Identification and Evolution to Expression in Response to *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(21), 5309. <https://doi.org/10.3390/ijms20215309>
- Beintema, J. J. (1994). Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Letters*, *350*(2–3), 159–163. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00753-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00753-5)
- Bishop, J. G., Dean, A. M., & Mitchell-Olds, T. (2000). Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(10), 5322–5327. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5322>
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T. (2009). trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, *25*(15), 1972–1973. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>
- Cardoso-Silva, C. B., Costa, E. A., Mancini, M. C., Balsalobre, T. W. A., Canesin, L. E. C., Pinto, L. R., Carneiro, M. S., Garcia, A. A. F., de Souza, A. P., & Vicentini, R. (2014). De Novo Assembly and Transcriptome Analysis of Contrasting Sugarcane Varieties. *PLoS ONE*, *9*(2), e88462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088462>
- Casacuberta, J. M., Puigdomnech, P., & Segundo, B. S. (1991). A gene coding for a basic pathogenesis-related (PR-like) protein from *Zea mays*. Molecular cloning and induction by a fungus (*Fusarium moniliforme*) in germinating maize seeds. *Plant Molecular Biology*, *16*(4), 527–536. <https://doi.org/10.1007/BF00023419>
- Cletus, J., Balasubramanian, V., Vashisht, D., & Sakthivel, N. (2013). Transgenic expression of plant chitinases to enhance disease resistance. *Biotechnology Letters*, *35*(11), 1719–1732. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1269-4>
- Cursi, D. E., Hoffmann, H. P., Barbosa, G. V. S., Bressiani, J. A., Gazaffi, R., Chapola, R. G., Fernandes Junior, A. R., Balsalobre, T. W. A., Diniz, C. A., Santos, J. M., & Carneiro, M. S. (2022). History and Current Status of Sugarcane Breeding, Germplasm Development and Molecular Genetics in Brazil. *Sugar Tech*, *24*(1), 112–133. <https://doi.org/10.1007/s12355-021-00951-1>
- dos Santos, C., & Franco, O. L. (2023). Pathogenesis-Related Proteins (PRs) with Enzyme Activity Activating Plant Defense Responses. *Plants*, *12*(11), 2226. <https://doi.org/10.3390/plants12112226>

- Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(3), 197–208. <https://doi.org/10.1038/nrm1589>
- Farag, A. M., Abd-Elnabey, H. M., Ibrahim, H. A. H., & El-Shenawy, M. (2016). Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42(2), 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2016.04.004>
- Fischer, R., Zekert, N., & Takeshita, N. (2008). Polarized growth in fungi – interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Molecular Microbiology*, 68(4), 813–826. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06193.x>
- Funkhouser, J. D., & Aronson, N. N. (2007). Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 96. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-96>
- Garsmeur, O., Droc, G., Antonise, R., Grimwood, J., Potier, B., Aitken, K., Jenkins, J., Martin, G., Charron, C., Hervouet, C., Costet, L., Yahiaoui, N., Healey, A., Sims, D., Cherukuri, Y., Sreedasyam, A., Kilian, A., Chan, A., Van Sluys, M.-A., ... D’Hont, A. (2018). A mosaic monoploid reference sequence for the highly complex genome of sugarcane. *Nature Communications*, 9(1), 2638. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05051-5>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571–607). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Goñi, O., Sanchez-Ballesta, M. T., Merodio, C., & Escribano, M. I. (2010). Potent cryoprotective activity of cold and CO₂-regulated cherimoya (*Annona cherimola*) endochitinase. *Journal of Plant Physiology*, 167(14), 1119–1129. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.04.009>
- Grover, A. (2012). Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 57–73. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.616043>
- Gu, Z., Eils, R., & Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*, 32(18), 2847–2849. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>
- Hakim, Ullah, A., Hussain, A., Shaban, M., Khan, A. H., Alariqi, M., Gul, S., Jun, Z., Lin, S., Li, J., Jin, S., & Munis, M. F. H. (2018). Osmotin: A plant defense tool against biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 123, 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.12.012>
- Jaswal, R., Rajarammohan, S., Dubey, H., Kiran, K., Rawal, H., Sonah, H., Deshmukh, R., & Sharma, T. R. (2023). Intrinsically Disordered Kiwellin Protein-Like Effectors Target Plant Chloroplasts and are Extensively Present in Rust Fungi. *Molecular Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00717-y>

- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A. F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S.-Y., Lopez, R., & Hunter, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, *30*(9), 1236–1240. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A., & Jermiin, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, *14*(6), 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Kasprzewska, A. (2003). Plant chitinases - regulation and function. *Cellular & Molecular Biology Letters*, *8*(3), 809–824.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kaur, H., Garber, L., Murphy, J. W., & Vinetz, J. M. (2022). Structure–function analysis of cysteine residues in the *plasmodium falciparum* chitinase, PfCHT1. *Protein Science*, *31*(5). <https://doi.org/10.1002/pro.4289>
- Kesari, P., Patil, D. N., Kumar, P., Tomar, S., Sharma, A. K., & Kumar, P. (2015). Structural and functional evolution of chitinase-like proteins from plants. *PROTEOMICS*, *15*(10), 1693–1705. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400421>
- Kozome, D., Sljoka, A., & Laurino, P. (2023). Beyond the Active Site: The addition of a remote loop reveals a new complex biological function for chitinase enzymes. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.02.27.530148>
- Lenardon, M. D., Munro, C. A., & Gow, N. A. (2010). Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, *13*(4), 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.05.002>
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Li, H., & Greene, L. H. (2010). Sequence and Structural Analysis of the Chitinase Insertion Domain Reveals Two Conserved Motifs Involved in Chitin-Binding. *PLoS ONE*, *5*(1), e8654. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008654>
- Ma, L.-S., Wang, L., Trippel, C., Mendoza-Mendoza, A., Ullmann, S., Moretti, M., Carsten, A., Kahnt, J., Reissmann, S., Zechmann, B., Bange, G., & Kahmann, R. (2018). The *Ustilago maydis* repetitive effector Rsp3 blocks the antifungal activity of mannose-binding maize proteins. *Nature Communications*, *9*(1), 1711. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04149-0>
- Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A. R. N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A., & Lopez, R. (2022). Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*, *50*(W1), W276–W279. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac240>

- Marín, M., & Ott, T. (2014). Intrinsic Disorder in Plant Proteins and Phytopathogenic Bacterial Effectors. *Chemical Reviews*, *114*(13), 6912–6932. <https://doi.org/10.1021/cr400488d>
- Mendes, J. F. (2022). *Protein-protein interaction between a candidate effector of S. scitamineum and a transcription factor of A. thaliana to study the smut-sugarcane pathosystem* [Universidade de São Paulo]. <https://doi.org/10.11606/D.11.2022.tde-11042022-152208>
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nature Methods*, *19*(6), 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
- Neuhaus, J. M., Sticher, L., Meins, F., & Boller, T. (1991). A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(22), 10362–10366. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.22.10362>
- Neuhaus, J.-M., Fritig, B., Linthorst, H. J. M., Meins, F., Mikkelsen, J. D., & Ryals, J. (1996). A revised nomenclature for chitinase genes. *Plant Molecular Biology Reporter*, *14*(2), 102–104. <https://doi.org/10.1007/BF02684897>
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, *32*(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Ohnuma, T., Numata, T., Osawa, T., Mizuhara, M., Lampela, O., Juffer, A. H., Skriver, K., & Fukamizo, T. (2011). A class V chitinase from *Arabidopsis thaliana*: gene responses, enzymatic properties, and crystallographic analysis. *Planta*, *234*(1), 123–137. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1390-3>
- Oyeleye, A., & Normi, Y. M. (2018). Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications. *Bioscience Reports*, *38*(4). <https://doi.org/10.1042/BSR20180323>
- Passarinho, P. A., & de Vries, S. C. (2002). *Arabidopsis Chitinases: a Genomic Survey*. *The Arabidopsis Book*, *1*, e0023. <https://doi.org/10.1199/tab.0023>
- Payan, F., Flatman, R., Porciero, S., Williamson, G., Juge, N., & Roussel, A. (2003). Structural analysis of xylanase inhibitor protein I (XIP-I), a proteinaceous xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*, var. Soisson). *Biochemical Journal*, *372*(2), 399–405. <https://doi.org/10.1042/bj20021802>
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, *8*(10), 785–786. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>
- Pierleoni, A., Martelli, P. L., Fariselli, P., & Casadio, R. (2006). BaCellLo: a balanced subcellular localization predictor. *Bioinformatics*, *22*(14), e408–e416. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl222>

- Price, N. P. J., Momany, F. A., Schnupf, U., & Naumann, T. A. (2015). Structure and disulfide bonding pattern of the hevein-like peptide domains from plant class IV chitinases. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *89*, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2014.11.004>
- Rajput, M. A., Rajput, N. A., Syed, R. N., Lodhi, A. M., & Que, Y. (2021). Sugarcane Smut: Current Knowledge and the Way Forward for Management. *Journal of Fungi*, *7*(12), 1095. <https://doi.org/10.3390/jof7121095>
- Rody, H. V. S., Bombardelli, R. G. H., Creste, S., Camargo, L. E. A., Van Sluys, M.-A., & Monteiro-Vitorello, C. B. (2019). Genome survey of resistance gene analogs in sugarcane: genomic features and differential expression of the innate immune system from a smut-resistant genotype. *BMC Genomics*, *20*(1), 809. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6207-y>
- Romero-Contreras, Y. J., Ramírez-Valdespino, C. A., Guzmán-Guzmán, P., Macías-Segoviano, J. I., Villagómez-Castro, J. C., & Olmedo-Monfil, V. (2019). Tal6 From *Trichoderma atroviride* Is a LysM Effector Involved in Mycoparasitism and Plant Association. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02231>
- Sánchez-Rodríguez, C., Bauer, S., Hématy, K., Saxe, F., Ibáñez, A. B., Vodermaier, V., Konlechner, C., Sampathkumar, A., Rüggeberg, M., Aichinger, E., Neumetzler, L., Burgert, I., Somerville, C., Hauser, M.-T., & Persson, S. (2012). CHITINASE-LIKE1/POM-POM1 and Its Homolog CTL2 Are Glucan-Interacting Proteins Important for Cellulose Biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *24*(2), 589–607. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.094672>
- Sánchez-Vallet, A., Mesters, J. R., & Thomma, B. P. H. J. (2015). The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(2), 171–183. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu003>
- Sarma, K., Dehury, B., Sahu, J., Sarmah, R., Sahoo, S., Sahu, M., Sen, P., Modi, M. K., & Barooah, M. (2012). A comparative proteomic approach to analyse structure, function and evolution of rice chitinases: a step towards increasing plant fungal resistance. *Journal of Molecular Modeling*, *18*(11), 4761–4780. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1470-8>
- Schaker, P. D. C., Palhares, A. C., Taniguti, L. M., Peters, L. P., Creste, S., Aitken, K. S., Van Sluys, M.-A., Kitajima, J. P., Vieira, M. L. C., & Monteiro-Vitorello, C. B. (2016). RNAseq Transcriptional Profiling following Whip Development in Sugarcane Smut Disease. *PLOS ONE*, *11*(9), e0162237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162237>
- Sigrist, C. J. A., de Castro, E., Cerutti, L., Cuche, B. A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L., & Xenarios, I. (2012). New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D344–D347. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1067>
- Singh, A., Isaac Kirubakaran, S., & Sakthivel, N. (2007). Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat. *Protein Expression and Purification*, *56*(1), 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.06.013>
- Song, F., & Goodman, R. M. (2001). Molecular biology of disease resistance in rice. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *59*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0353>

- Souza, T. P., Dias, R. O., & Silva-Filho, M. C. (2017). Defense-related proteins involved in sugarcane responses to biotic stress. *Genetics and Molecular Biology*, *40*(1 suppl 1), 360–372. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0057>
- Stigliano, E., Di Sansebastiano, G.-P., & Neuhaus, J.-M. (2014). Contribution of Chitinase A's C-Terminal Vacuolar Sorting Determinant to the Study of Soluble Protein Compartmentation. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(6), 11030–11039. <https://doi.org/10.3390/ijms150611030>
- Su, Y., Xu, L., Fu, Z., Yang, Y., Guo, J., Wang, S., & Que, Y. (2014). ScChi, Encoding an Acidic Class III Chitinase of Sugarcane, Confers Positive Responses to Biotic and Abiotic Stresses in Sugarcane. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(2), 2738–2760. <https://doi.org/10.3390/ijms15022738>
- Su, Y., Xu, L., Wang, S., Wang, Z., Yang, Y., Chen, Y., & Que, Y. (2015). Identification, Phylogeny and Transcript of Chitinase Family Genes in Sugarcane. *Scientific Reports*, *5*(1), 10708. <https://doi.org/10.1038/srep10708>
- Sudbery, P. E. (2008). Regulation of polarised growth in fungi. *Fungal Biology Reviews*, *22*(2), 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2008.07.001>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tanaka, J., Fukamizo, T., & Ohnuma, T. (2017). Enzymatic properties of a GH19 chitinase isolated from rice lacking a major loop structure involved in chitin binding. *Glycobiology*, *27*(5), 477–485. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx016>
- Teixeira-Silva, N. S., Schaker, P. D. C., Rody, H. V. S., Maia, T., Garner, C. M., Gassmann, W., & Monteiro-Vitorello, C. B. (2020). Leaping into the Unknown World of *Sporisorium scitamineum* Candidate Effectors. *Journal of Fungi*, *6*(4), 339. <https://doi.org/10.3390/jof6040339>
- Thomma, B. P., Penninckx, I. A., Cammue, B. P., & Broekaert, W. F. (2001). The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Current Opinion in Immunology*, *13*(1), 63–68. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00183-7](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00183-7)
- Uversky, V. N., Oldfield, C. J., & Dunker, A. K. (2005). Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling. *Journal of Molecular Recognition*, *18*(5), 343–384. <https://doi.org/10.1002/jmr.747>
- Vaghela, B., Vashi, R., Rajput, K., & Joshi, R. (2022). Plant chitinases and their role in plant defense: A comprehensive review. *Enzyme and Microbial Technology*, *159*, 110055. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110055>
- van Esse, H. P., Bolton, M. D., Stergiopoulos, I., de Wit, P. J. G. M., & Thomma, B. P. H. J. (2007). The Chitin-Binding *Cladosporium fulvum* Effector Protein Avr4 Is a Virulence Factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, *20*(9), 1092–1101. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-9-1092>

- van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44(1), 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
- Walliwalagedara, C., Atkinson, I., van Keulen, H., Cutright, T., & Wei, R. (2010). Differential expression of proteins induced by lead in the Dwarf Sunflower *Helianthus annuus*. *Phytochemistry*, 71(13), 1460–1465. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.05.018>
- Xu, F., Fan, C., & He, Y. (2007). Chitinases in *Oryza sativa* ssp. japonica and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Genetics and Genomics*, 34(2), 138–150. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(07\)60015-0](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(07)60015-0)
- Yang, H., Zhang, T., Masuda, T., Lv, C., Sun, L., Qu, G., & Zhao, G. (2011). Chitinase III in pomegranate seeds (*Punica granatum* Linn.): a high-capacity calcium-binding protein in amyloplasts. *The Plant Journal*, 68(5), 765–776. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04727.x>
- Zhang, J., Zhang, X., Tang, H., Zhang, Q., Hua, X., Ma, X., Zhu, F., Jones, T., Zhu, X., Bowers, J., Wai, C. M., Zheng, C., Shi, Y., Chen, S., Xu, X., Yue, J., Nelson, D. R., Huang, L., Li, Z., ... Ming, R. (2018). Allele-defined genome of the autopolyploid sugarcane *Saccharum spontaneum* L. *Nature Genetics*, 50(11), 1565–1573. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0237-2>
- Zhang, S., Li, C., Si, J., Han, Z., & Chen, D. (2022). Action Mechanisms of Effectors in Plant-Pathogen Interaction. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6758. <https://doi.org/10.3390/ijms23126758>
- Zhang, Y.-J., Ren, L.-L., Lin, X.-Y., Han, X.-M., Wang, W., & Yang, Z.-L. (2022). Molecular evolution and functional characterization of chitinase gene family in *Populus trichocarpa*. *Gene*, 822, 146329. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146329>
- Zribi, I., Ghorbel, M., & Brini, F. (2021). Pathogenesis Related Proteins (PRs): From Cellular Mechanisms to Plant Defense. *Current Protein & Peptide Science*, 22(5), 396–412. <https://doi.org/10.2174/1389203721999201231212736>