

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



Caracterização funcional do gene *soy BiP* em resposta a estresses bióticos

GRAZIELLE DA MOTA ALCÂNTARA

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Março de 2020

GRAZIELLE DA MOTA ALCÂNTARA

Caracterização funcional do gene *soy* BiP em resposta a estresses bióticos

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

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Março de 2020

A347 Alcântara, Grazielle da Mota.
Caracterização funcional do gene soy BiP em resposta a estresses bióticos / Grazielle da Mota Alcântara. – Ilhéus, BA: UESC, 2020.
vii, 64f. : il.

Orientadora: Fátima Cerqueira Alvim.
Co-orientador: Marcio Gilberto Cardoso Costa.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.
Referências: f. 54-64.

1. Cacaueiro – Doenças e pragas. 2. Plantas – Melhoramento genético. 3. Vassoura-de-bruxa (Fitopatologia).
4. Plantas transgênicas. I. Título.

CDD 633.74

GRAZIELLE DA MOTA ALCÂNTARA

Caracterização funcional do gene *soy* BiP em resposta a estresses bióticos

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

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

APROVADA: 18 de Março de 2020

Dr^a. Dahyana Santos Britto

Dr^a. Fabienne Micheli
(UESC)

Dr^a. Karina Peres Gramacho
(UESC/CEPLAC/CEPEC)

Dr^a. Fátima Cerqueira Alvim
(UESC - ORIENTADORA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço À FAPESB, pela concessão de bolsas. A minha orientadora Dr^a. Fátima Alvim por todas as oportunidades, suporte, confiança, orientação e paciência. E ao co-orientador, Dr. Márcio Costa, por me fornecer o suporte e por todo apoio concedido.

Agradeço a Deus por tantas oportunidades, pela vida, pelo amor que tem por mim, por mais uma etapa concluída e pela força e coragem concedida para finalizar esse trabalho.

Minha família por tanto amor, cuidado e paciência. Especialmente a minha mamãe, vovó, tia Luiza, minhas queridas irmãs e meu padrasto. Vocês são minha sustentação!

Minha filhinha Giulia, você me dá força, você me transformou obrigada!

Ao meu amado esposo Ailann por cuidar tão bem de mim, me acalmar, enxugar minhas lágrimas e principalmente vibrar com minhas conquistas. Meu amor é todo seu!

As amigadas tão importantes, que nos impulsionam e nos ajudam a ser melhor Gláucia, Natasha, Monique, Dilson, Maria, Thainara, Monalisa, Keilanne, Geiseane, Maria Luiza, Andria, Paulo e Cláudia, saibam que sem vocês nada seria possível, serei eternamente grata!

A todos do Centro de Genética e Biotecnologia (CBG), LCT e Proteômicos, por facilitar o desenvolvimento da pesquisa. Aos técnicos, Flávio e Vanessa pela disposição e carinho.

E a todos que fizeram parte dessa conquista. GRATIDÃO!

**“Agradeço todas as dificuldades
que enfrentei se não fosse por elas,
eu não teria saído do lugar”.**

Chico Xavier

ÍNDICE

EXTRATO	VII
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 O CACAUEIRO	11
2.2 INTERAÇÃO CACAU / <i>MONILIOPHTHORA PERNICIOSA</i>	13
2.3 BIDDING IMUNNOGLOBULIN PROTEIN (BiP).....	16
3. HIPÓTESE	19
4. OBJETIVOS	19
4.1 OBJETIVO GERAL	19
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
5. MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISES DOS GENES BIPS DE TOMATE E CACAU.....	19
5.2 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS DE TOMATE	20
5.2.1 Vetor de Transformação	20
5.2.2 Material vegetal	20
5.2.3 Transformação genética de <i>Solanum lycopersicum</i> via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
5.2.4 Análise das plantas transgênicas por PCR.....	22
5.3 1D-SDS-PAGE E <i>immunoblotting</i>	23
5.4 AVALIAÇÃO DOS SINTOMAS DE VASSOURA-DE-BRUXA EM TOMATEIROS NÃO TRANSFORMADOS E TRANSGÊNICOS INOCULADOS COM <i>M. perniciosa</i>	24
5.5 ACÚMULO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H ₂ O ₂)	25
5.6 COLETA DE FRUTOS DE PLANTAS NÃO TRANSFORMADAS E TRANSFORMADAS SOB ATAQUE DA MOSCA BRANCA (<i>Bemisia tabaci</i>)	26
5.7 OBTENÇÃO E COMPARAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO DE PLANTAS TRANSFORMADAS E NÃO TRANSFORMADAS	26
5.7.1 Obtenção das proteínas.....	26
5.7.2 Eletroforese 2D	27
5.7.3 Visualização dos spots e análise de imagens	27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6.1 IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS GENES BIP EM <i>Theobroma cacao</i> E <i>Solanum lycopersicum</i>	28
6.2 PLANTAS TRANSFORMADAS SUPEREXPRESSANDO O GENE <i>soyBiP</i> EM TOMATE	34
6.3 AVALIAÇÃO DOS SINTOMAS DE VASSOURA-DE-BRUXA EM TOMATEIROS INOCULADOS COM <i>M. perniciosa</i>	36
6.4 AVALIAÇÃO DE FRUTOS E SEMENTES DE PLANTAS CONTROLES E TRANSFORMADAS SOB ATAQUE DA MOSCA BRANCA (<i>Bemisia tabaci</i>)	47
6.5 OBTENÇÃO E COMPARAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE PLANTAS TRANSFORMADAS E NÃO TRANSFORMADAS	50
7. CONCLUSÃO	52
8. REFERÊNCIAS	54

EXTRATO

ALCÂNTARA, Grazielle da Mota. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Março de 2020. **Caracterização funcional do gene soy BiP em resposta a estresses bióticos**. Orientador: Prof^a. Dr^a. Fátima Cerqueira Alvim. Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa.

O cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) é considerado uma das culturas mais importantes mundialmente por suas amêndoas serem utilizadas como fonte de matéria-prima principalmente na fabricação do chocolate. A lavoura do cacau sempre gerou a maior fonte de renda da região sul da bahia, mas nas últimas décadas a produção de cacau vem sofrendo grandes danos em função da ação do fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*, fungo causador da doença vassoura de bruxa. Seu desenvolvimento provoca alterações histológicas, morfológicas, fisiológicas e temporais nos tecidos do cacaueiro. Vários genes que codificam para proteínas relacionadas com funções moleculares importantes vêm sendo estudados para controle da doença. BiP (*Binding immunoglobulin Protein*) é uma chaperona pertencente a família gênica HSP70 que desempenha um papel importante na regulação de processos no Retículo Endoplasmático (RE) e proteção celular durante estresses. Neste trabalho, investigamos a funcionalidade do gene soyBiP (gene BiP isolado da soja), na tolerância a estresses bióticos causado por pragas em plantas geneticamente modificadas de *Solanum lycopersicum*. Onde foi realizada a caracterização *in silico* das famílias gênicas de BiP em tomate e cacau, sendo identificados nas análises dois genes que codificam para a proteína em cacau denominados TcBiP1 e TcBiP2 e quatro genes em tomate denominados SolBiP1, SolBiP2, SolBiP3 e SolBiP4. Foram feitas inoculações com *M. perniciosa* nas plantas superexpressando o gene soyBiP e plantas controle, onde as plantas transformadas geneticamente, mostraram maior tolerância aos sintomas causados pela infecção do fungo em relação as plantas não transformadas. As plantas superexpressando o gene soyBiP e inoculadas com *M. perniciosa*, também apresentaram um menor acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) quando comparadas as plantas controle e não inoculadas. Essas plantas transgênicas ainda apresentaram uma melhor resposta em tamanho e quantidade de frutos e sementes, sob ataque da mosca branca (*Bemisia tabaci*). Outra abordagem utilizada nesse estudo foi a obtenção e comparação do perfil proteico de linhagens transformadas e não transformadas, demonstrando diferenças numéricas de spots, onde a quantidade na linhagem transgênica foi superior em comparação a controle. Com esta estratégia espera-se aumentar o patamar do conhecimento acerca do gene BiP, visando desenvolver novas metodologias de combate a vassoura de bruxa e outras pragas.

Palavras-chave: BiP. Transformação genética. Vassoura de bruxa.

ABSTRACT

ALCÂNTARA, Grazielle da Mota. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Março de 2020. **Caracterização funcional do gene soyBiP em resposta a estresses bióticos**. Advisor: Prof^a. Dr^a. Fátima Cerqueira Alvim. Co-advisor: Prof. Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa.

The cacao tree (*Theobroma cacao* L.) is considered one of the most important crops worldwide because its almonds are used as a source of raw material mainly in the manufacture of chocolate. The cocoa crop has always generated the greatest source of income in the southern region of Bahia, but in recent decades cocoa production has suffered great damage due to the action of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*, fungus that causes witches' broom disease. Its development causes histological, morphological, physiological and temporal alterations in the cocoa tissues. Several genes that code for proteins related to important molecular functions have been studied to control the disease. BiP (Binding immunoglobulin Protein) is a chaperone belonging to the HSP70 gene family that plays an important role in the regulation of processes in the Endoplasmic Reticulum (ER) and cell protection during stress. In this work, we investigated the functionality of the soyBiP gene (BiP gene isolated from soy), in the tolerance to biotic stresses caused by pests in genetically modified plants of *Solanum lycopersicum*. Where the silico characterization of the BiP gene families in tomatoes and cocoa was carried out, two genes that code for the protein in cocoa named TcBiP1 and TcBiP2 and four genes in tomatoes named SolBiP1, SolBiP2, SolBiP3 and SolBiP4 were identified in the analyzes. Inoculations were made with *M. perniciosa* in plants overexpressing the soyBiP gene and control plants, where genetically transformed plants showed greater tolerance to symptoms caused by fungus infection compared to untransformed plants. Plants overexpressing the soyBiP gene and inoculated with *M. perniciosa*, also showed a lower accumulation of reactive oxygen species (ROS) when compared to control and uninoculated plants. These transgenic plants still showed a better response in size and quantity of fruits and seeds, under attack by the whitefly (*Bemisia tabaci*). Another approach used in this study was to obtain and compare the protein profile of transformed and non-transformed strains, showing numerical differences in spots, where the amount in the transgenic strain was higher compared to control. With this strategy, it is expected to increase the level of knowledge about the BiP gene, aiming to develop new methodologies to combat witches' broom and other pests.

Keywords: BiP. Genetic transformation. Witch's broom.

1. INTRODUÇÃO

O cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta arbórea, perene, de clima tropical, nativa da América do Sul nas regiões de florestas úmidas (DIAS, 2001; RUSCONI & CONTI, 2010; THOMAS et al., 2012). É considerada uma das culturas mais importantes mundialmente por suas amêndoas serem utilizadas como fonte de matéria-prima na indústria farmacêutica, de cosméticos e sobretudo, na fabricação do chocolate (TEIXEIRA et al., 2015). As principais zonas produtoras de cacau no Brasil são a região Amazônica e o Sul da Bahia, locais que apresentam as condições edafoclimáticas propícias para o estabelecimento da lavoura (MOTAMAYOR et al., 2002; HEBBAR, 2007).

A lavoura do cacau é a maior geradora de fonte de renda da região sul baiana, mas nas últimas décadas, a produção vem sofrendo grandes perdas em função da ação do fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*, fungo causador da doença vassoura de bruxa. Estima-se que em uma década de 1990 a 2000, houve uma queda na produção de cacau no Brasil em 75% (HEBBAR, 2007; EVANS, 2016; ICCO, 2017). A doença só induz a morte do hospedeiro se a infecção ocorrer em plantas jovens, em decorrência da destruição das regiões meristemáticas. Em contrapartida, quando a infecção ocorre em plantas adultas a produtividade é drasticamente afetada, pois o patógeno leva a inviabilização das sementes, diminuição potencial na produção de frutos bem como no seu desenvolvimento. (SENA et al., 2014; EVANS, 2016).

O patógeno *M. perniciosa* é um fungo hemibiotrófico, que possui duas fases distintas no ciclo de vida, uma biotrófica e outra saprofítica. No decorrer da interação planta-patógeno, observam-se alterações histológicas, morfológicas, fisiológicas e temporais nos tecidos infectados do cacaueiro (FRIAS et al., 1991; ORCHARD et al., 1994; SCARPARI et al., 2005; CEITA et al., 2007; SENA et al., 2014). A infecção se inicia quando os tubos germinativos dos basidiósporos penetram em tecidos jovens da planta via estômatos, epiderme ou tricomas (KILARU; HASENSTEIN, 2005; GRAMACHO, 2014; EVANS, 2016). Essas hifas primárias ramificam-se e colonizam o espaço intercelular da planta, propagando preferencialmente nos tecidos do córtex e da medula do caule (SILVA & MATSUOKA, 1999; SILVA et al., 2002; EVANS, 2016).

Com a progressão do ciclo da doença, surge o aparecimento de grampos de conexão entre as células das hifas e formação do micélio dicariótico, que penetra na célula vegetal, acarretando na morte do tecido, caracterizada como fase necrotrófica do patógeno (PURDY E SCHMIDT, 1996; SILVA et al., 2002; EVANS, 2016). Eventualmente, após a alternância de períodos de alta e baixa umidade, as hifas secundárias produzem, no ramo seco de cacau, basidiocarpos contendo basidiósporos, completando o ciclo de vida do fungo.

A resposta do hospedeiro, localizada a partir do ponto de infecção resulta no inchaço da parte afetada, ocasionado pela rápida divisão celular e aumento do tamanho das células, além da quebra de dominância apical dos ramos infectados, levando a um considerável aumento de tecidos e desenvolvimento de ramos laterais (ORCHARD et al., 1994; Griffith et al., 2003; CEITA et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2015). Em conjunto, estes sintomas conferem ao ramo vegetativo do cacau a aparência de uma vassoura e a este ramo dá-se o nome de vassoura verde, que permanece assim por um longo e progressivo período de tempo e de desenvolvimento fúngico. Após o período de um a dois meses, os ramos começam a se modificar tornando-se marrons, secando progressivamente a partir do ápice, até ficarem completamente secos, quando passam a ser denominados de vassoura seca (EVANS, 1980; LAWRENCE et al., 1991; LEAL et al., 2010).

Desvendar os mecanismos moleculares envolvidos na interação cacau/ *M. pernicioso* é imprescindível para compreender as peculiaridades desse patossistema. Neste sentido, as informações geradas com sequenciamento genômico (MONDEGO et al., 2008) e de bibliotecas de cDNA representativas das diferentes fases do ciclo de vida do *M. pernicioso* (RINCONES et al., 2008; PIRES et al., 2012) trouxeram informações relevantes para a compreensão das bases moleculares do desenvolvimento do patógeno. Essas informações, aliadas as geradas com o sequenciamento de cDNAs representativos da interação compatível e incompatível de cacau/ *M. pernicioso* (GESTEIRA et al., 2007) bem como os estudos proteômicos englobando ambos os organismos do patossistema vassoura de bruxa, vem gerando informações importantes para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos especificamente na interação cacau/ *M. pernicioso* (SCARPARI et al., 2005; CEITA et al., 2007).

Com os avanços nos estudos, puderam ser identificadas algumas famílias genicas que vem sendo propostas como possíveis candidatos de resistência à vassoura de bruxa do cacau (PUNGARTNIK et al., 2009; ARGOUT et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2014). Dentre esses, algumas (PRs) de cacau que é uma classe de proteínas relacionadas a patogênese que são sintetizadas pela planta para a sua defesa quando sofrem ataques de patógenos.(MENEZES et al., 2012; JAIN; KHURANA, 2018).

Outro gene estudado em estresses é o gene *BiP* (*Binding immunoglobulin protein*) que codifica uma chaperona molecular de retículo endoplasmático (RE) pertencente a família das HSP70 (Proteínas de choque térmico). Esse chaperone molecular desempenha um papel importante na translocação de proteínas, na regulação de processos no RE, na catálise do dobramento de proteínas da rota secretora e endereçamento das proteínas malformadas para rota de degradação (HAMMOND & HELENIUS, 1995; GALILI et al., 1998;. VITALE & DENECKE, 1999). Esse gene já foi identificado em todos os genomas de organismos eucariotos (BOSTON et al., 1996; SAIBIL, 2015).

Sabe-se que o aumento da atividade secretora ou o acúmulo de proteínas mal dobradas dentro do RE resultam na indução da expressão de *BiP* mediante ativação de uma rota de sinalização denominada Unfolded Protein Response (UPR). Essa rota é desencadeada pela diminuição na quantidade de *BiP* livre no RE. A cascata de sinalização, mediada por fosforilação de proteínas IRE, levam ao aumento na expressão do gene bem como no processamento alternativo do RNAm gerando ampliação na meia vida do mesmo, com essa estratégia, o nível de *BiP* aumenta no RE. Sabidamente, situações que induzem estresse em retículo, como estresse biótico ou abiótico, induzem a UPR. O aumento no nível de *BiP* está relacionado a proteção dos organismos contra os possíveis danos celulares (BOSTON et al., 1996; PEDRAZZINI & VITALE, 1996). Em plantas particularmente, diversos trabalhos científicos descrevem que a superexpressão desse gene via transgenia está diretamente relacionada ao aumento da tolerância a estresses abióticos, como o déficit hídrico (CASCARDO et al., 2000; ALVIM et al., 2001; VALENTE et al., 2009) e bióticos, como infestações por fungos e ataques de insetos (KALINSKI et al., 1995; LIEBRAND et al., 2014).

No estudo feito por (ALVIM et al., 2001) foram utilizados clones de *BiP* de Soja (*Glycine max*) denominado soyBiPD, onde foram obtidas plantas

geneticamente modificadas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que superexpressavam o gene, e essas adquiriram tolerância ao déficit de água durante o seu crescimento. Diante disso, investigamos a ação do chaperone molecular BiP na tolerância de plantas a estresse biótico em linhagens transgênicas de tomate que expressam um cDNA de BiP de soja (*Glycine max*). Tendo como objetivo Utilizar a interação *Lycopersicum esculentum* (Micro-tom)/*M. pernicioso*, sendo as plantas de micro-tom geneticamente modificadas com o gene soyBiPD (BiP de soja) para investigar sua funcionalidade em conferir tolerância à estresse biótico. Os resultados obtidos a partir deste trabalho podem aumentar o patamar de conhecimento acerca das funções do gene BiP e suas potencialidades para o uso em transgenia e melhoramento genético em vegetais para o controle de doenças.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O CACAUEIRO

O cacau (*Theobroma cacao* L.), pertencente à família Malvaceae, é uma espécie arbórea, perene, nativa das florestas tropicais úmidas da América do Sul, sendo dispersa para as regiões tropicais da América Central e Norte. É uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo, já que, economicamente é explorada para produção de sementes que compõe a base de chocolates e derivados (MOTAMAYOR et al., 2002; RUSCONI & CONTI, 2010; THOMAS et al., 2012).

O alto valor econômico do cacau advém de suas amêndoas que são a principal fonte de matéria-prima para fabricação do chocolate. Seus frutos ainda são utilizados pela indústria alimentícia na fabricação de outros subprodutos, como sucos e geléias, na indústria de cosmetologia e farmacêutica, pois possuem propriedades antioxidantes, diuréticas e vasodilatadoras (DONALD, 2004; OTHMAN et al., 2007; KRÄHMER et al., 2015; HO et al., 2015).

As regiões para o cultivo do cacau são restritas às necessidades climáticas da cultura, estando principalmente localizados no Brasil, Equador e países da África. Em termos de produção, atualmente, a África é o maior produtor, responsável por 70% da produção mundial. Nos países da África, Costa do Marfim se destaca como o principal produtor, com aproximadamente, 42% do mercado mundial, seguido por Gana (19%), Camarões (5%) e Nigéria (5%) (DILLINGER et al., 2000; WOOD &

LASS 2008; BEG et al., 2017; FAO, 2017; WICKRAMASURIYA & DUNWELL, 2018). O Brasil já foi o maior produtor e exportador de cacau, no entanto, atualmente ocupa o sétimo lugar no ranking mundial, e segundo da América do Sul com uma produção estimada em 4%, ficando atrás do Equador com 6% (IBGE, 2019).

Se tratando da produção cacaueira no território brasileiro, os estados de maior destaque na produção dessa cultura, segundo dados recentes do IBGE, são a Bahia e o Pará. Em que a maior produção anual pertence ao estado da Bahia, com cerca de 140 mil toneladas e a maior produtividade é do estado do Pará, com uma produção por hectare três vezes maior que o estado baiano. Estima-se que o cultivo no Brasil alcance cerca de 10 milhões de hectares, com uma produção de quatro toneladas (IBGE, 2019).

O ápice do cultivo do cacau na região do Sul da Bahia ocorreu em meados de 1970 a 1980, com uma produção máxima de 400.000 toneladas de amêndoas secas registradas até o ano de 1986. No entanto, devido aos problemas surgidos com a introdução do fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*, fungo causador da doença vassoura de bruxa, no final da década de 1980, a produção do cacau no Brasil, atravessou a sua maior crise e a doença se disseminou rapidamente reduzindo drasticamente a produtividade e a qualidade das amêndoas. Estima-se que as perdas na produção de cacau em decorrência à vassoura de bruxa atingiram um patamar de quase 80% em prejuízo ao setor no final da década de 1990, colocando a Bahia, até então principal produtora de cacau mundial, na posição de importadora de amêndoas, reduzindo a produção de 400 mil toneladas dos grãos para 123 mil toneladas (PEREIRA et al., 1989; AGRIANUAL, 2004; HEBBAR, 2007; TEIXEIRA et al., 2015; AL/MEIDA, 2016).

Três grupos para *T. cacao*, já foram descritos: Criollo (*T. cacao* spp. *Criollo*); Forastero (*T. cacao* spp. *Sphaerocarpum*) e Trinitário, que estão divididos por variações na morfologia e anatomia interespecífica. O Trinitário, resultado do cruzamento entre as variedades Criollo e Forastero é o mais utilizado, basicamente, por apresentar maior produtividade e tolerância a patologias (CHEESMAN, 1944; PRIDMORE et al., 2000; MOTAMAYOR et al., 2002). Atualmente, a base genética dos clones utilizados pelos agricultores no Brasil é estreita, a alta variabilidade genética do fungo *M. perniciosa* vem permitindo a quebra na resistência em progênies de cacaueiro oriundos dos cruzamentos. Devido a este fato, a obtenção de novas fontes de resistência ao fungo tem sido um dos principais objetivos dos

programas de melhoramento do cacauzeiro (GRAMACHO et al., 2006; PIRES et al., 2012).

2.2 INTERAÇÃO CACAU-MONILIOPTHORA PERNICIOSA

Dentre as doenças causadas por patógenos que atingem o cacauzeiro e que ocasionam perdas na sua produção, como murcha de ceratocystis causada pelo *Ceratocystis cacaofunesta* (PLOETZ, 2007) e podridão-parda causada pelo oomiceto *Phytophthora spp.* (OLIVEIRA;LUZ, 2005; GRIFFITH et al., 2003; EVANS et al., 2013), a vassoura de bruxa causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, é considerada economicamente uma das patologias mais danosas para essa cultura (SOUZA et al., 2018).

M. perniciosa é um fungo basidiomicota com ciclo de vida hemibiotrófico, apresentando dois estágios de desenvolvimento, um monocariótico (biotrófico) e outro dicariótico (necrotrófico) (EVANS, 1980). Seus basidiósporos uninucleados são dispersos pelo vento e favorecidos pela alta umidade. Esses fatores tornam o ambiente favorável para transposição do fungo ao hospedeiro que germina nos tecidos jovens em desenvolvimento, como folhas, ramos e frutos ou penetram a partir de aberturas, como ferimentos, tricomas e estômatos, dando início a fase biotrófica da doença (MEINHARDT et al., 2006; MEINHARDT et al. 2014).

A primeira fase do ciclo de vida de *M. perniciosa* é caracterizada pela formação do micélio monocariótico que não possui grampos de conexões. As hifas monocarióticas são espessas e crescem lentamente nos espaços intercelulares da planta, onde se ramificam e retiram nutrientes necessários para o seu desenvolvimento. Os sintomas iniciais da doença observado nas plantas são: hipertrofia e hiperplasia dos tecidos infectados decorrentes da rápida divisão celular e incremento no tamanho das células, formação de frutos partenocárpico, perda da dominância apical e proliferação de brotos axilares, resultando em ramos anormais chamados “vassouras verdes” (Figura 1) (GRIFFITH et al. 2003; MEINHARDT et al., 2008; SENA et al. 2014; EVANS, 2016). Quando a infecção acontece nas almofadas florais, a infecção irá produzir flores anormais que poderão se desenvolver em frutos que crescem com má formação, chamados de “morango”. Já quando a infecção pelo fungo ocorre diretamente no fruto jovem, pode provocar um tipo típico de fruto em

formato de “cenoura” que posteriormente irá necrosar ocasionando na sua morte (PEREIRA, 2000; OLIVEIRA; LUZ, 2007).

O ciclo da doença segue com a transição de hifa monocariótica para dicariótica, com a formação de grampos de conexão entre as células das hifas. O micélio dicariótico penetra na célula ocasionando modificações no hospedeiro que levam a necrose dos ramos infectados vegetal levando a morte do tecido, caracterizando a fase necrotrófica do patógeno (EVANS, 1980; LAWRENCE et al., 1991; PURDY; SCHMIDT, 1996; SILVA et al., 2011). A colonização do fungo culmina na progressão da doença, gerando mudanças morfológicas e moleculares nas plantas de cacau, causando à morte do tecido e estimulando a formação de novos basidiósporos. Esses irão se dispersar para outra região da mesma planta infectada ou em uma nova planta, reiniciando o ciclo (Figura 1) (ALMEIDA et al., 1997; MEINHARDT et al., 2008).

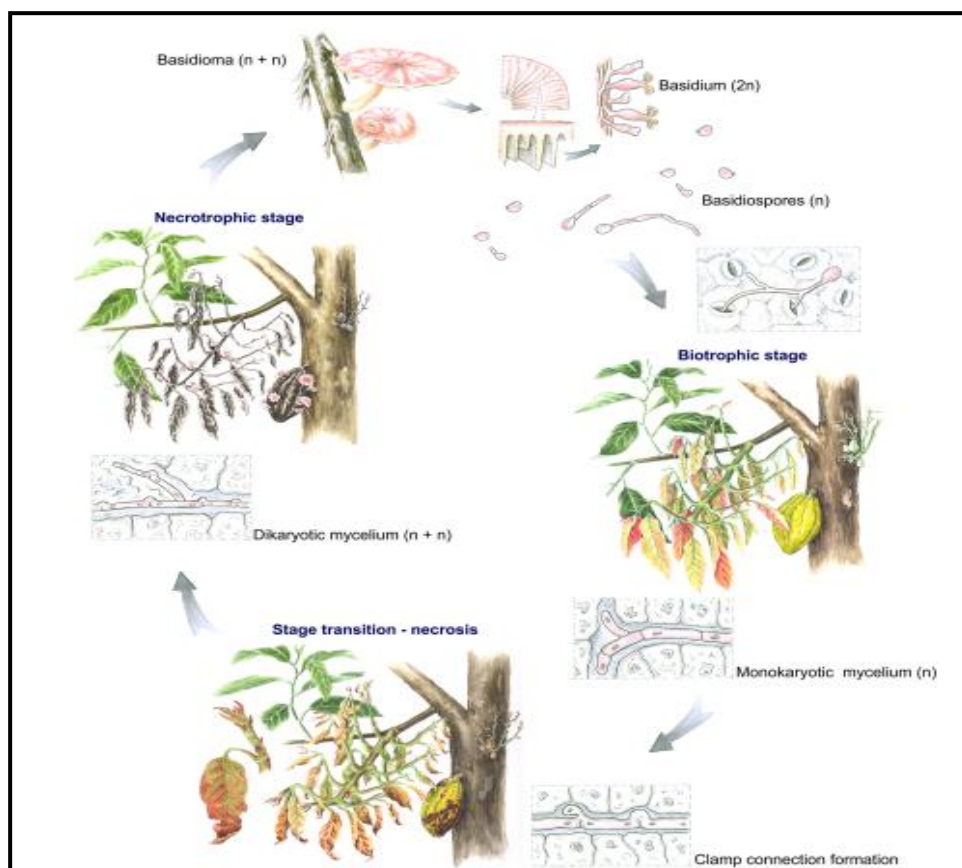


Figura 1. Ciclos de vida *M. perniciosa* e sintomas da doença no cacau. Fases biotrófica e necrotrófica. Fonte: TEXEIRA et al., 2015.

Como resposta de defesa a agentes patogênicos, as plantas utilizam como primeira barreira física e química estruturas pré-existentes como ceras presentes nas cutículas, tricomas e estômatos que dificultam a entrada e disseminação do patógeno (MARTIN, 1964; RODA et al., 2003; INDAH et al., 2013; SENA et al., 2014). Além dessas estruturas, as plantas desenvolveram um sistema de proteção que os reconhecem e impedem os invasores levando a uma diminuição nos danos causados (DODDS & RATHJEN, 2010). Na primeira fase de interação planta/patógeno as plantas são capazes de reconhecer as PAMPs (moléculas associadas ao patógeno) ou MAMPs (padrões moleculares associados a microrganismos) através de receptores de reconhecimento padrões (PRRs) que estão localizados tanto na superfície das células vegetais como no seu interior (KAMOUN, 2006; BOLLER; FELIX, 2009).

O reconhecimento das PAMPs pelos PRRs irá ativar uma resposta de defesa onde ocorrerá uma reprogramação transcricional mediada por fatores específicos, que constitui o sistema imune da planta, essa será ativada e estimulará a acionamento de sinais para primeira resposta de defesa da planta, denominada imunidade desencadeada pelo patógeno (PTI) (CHISHOLM et al., 2006; BOLLER; FELIX, 2009). Dessa forma, diversos sinais são estimulados e sua ativação resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), acúmulo de compostos antimicrobianos, intumescimento de paredes celulares e regulação positiva de genes relacionados a defesa (MACHO & ZIPFEL, 2014).

Os patógenos que ultrapassarem essa primeira barreira liberam moléculas efetoras que elevam a sua virulência e estimulam uma segunda resposta de defesa da planta, que é mais atenuada que a primeira. A segunda etapa da resposta de defesa da planta é mais especializada, e detecta a liberação de efetores pelos microrganismos. Sendo chamada de imunidade desencadeada pelo efector (ETI) (DODDS; RATHJEN, 2010). Esse reconhecimento pode ser direto ou indireto e sua resposta proporciona resistência ao patógeno e que, geralmente, induz a morte celular nos tecidos infectados, desencadeando a doença (HOGENHOUT et al., 2009; WIRTHMUELLER et al., 2013).

A compreensão da biologia do fungo trouxe grandes avanços a partir do seu sequenciamento no ano de 2008, revelando as primeiras sequências de DNA do patógeno (MONDENGO et al., 2008). O avanço das informações geradas com sequenciamento genômico e de bibliotecas de cDNA das diferentes fases do ciclo de

vida da *M. perniciosa* trouxeram informações para a compreensão das bases moleculares do desenvolvimento do fungo, o que possibilitou a identificação de vários genes que codificam para proteínas relacionadas com funções moleculares importantes para o desenvolvimento da doença vassoura-de-bruxa (RINCONES et al., 2008; PIRES et al., 2012). Essas informações, aliadas com estudos proteômicos e sequenciamento de cDNAs representativos das interações compatível e incompatível de cacau-*M. perniciosa*, vem gerando informações importantes para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nesse patossistema (SCARPARI et al., 2005; CEITA et al., 2007; GESTEIRA et al., 2007).

Além de infectar e ter como principal hospedeiro o cacau, já foram classificados outros biótipos do fungo (Mp) como o biótipo B, que infecta família Bixaceae, biótipo C associado à infecção da família Malvaceae como cacau e cupuaçu, biótipo L, infectando as famílias Bignoniaceae, Malpighiaceae e Arrabidaea verrucosa e biótipo S infectando as Solanaceas. Entre a família Solanaceae, foram relatadas como hospedeiras as espécies jurubeba (*Solanum paniculatum* L.), jiló (*Solanum gilo* Raddi), caiçara (*Solanum stipulaceum*) berinjela (*Solanum melongena* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.), pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) e lobeira (*Solanum lycocarpum* A.) (BASTOS & EVANS, 1985; EVANS, 1978; GRIFFITH & HEDGER, 1994a; GRIFFITH & HEDGER, 1994b; RINCONES et al., 2006).

Tendo em vista a elevada importância em expandir os conhecimentos da interação planta/patógeno e as dificuldades em realizar trabalhos com cacau por seu longo ciclo de vida, a realização de experimentos utilizando o tomate como organismo modelo de estudo, proporciona avanços nas pesquisas que podem ajudar a elucidar a interação entre cacau e *M. perniciosa*. Foi descrito que a infecção pelos biótipos C e S possuem os ciclos (biotróficos e necrotróficos) muito semelhantes, o que causa sintomas típicos como hiperbrotação, formação de vassouras e inchamento das hastes (DE ARRUDA et al., 2003; MARELLI et al., 2009). Diante disso, o tomateiro *Solanum lycopersicum* permite estudos para avaliação do patossistema, por possuir um ciclo de vida curto e ser suscetível a infecção do fungo pelo biótipo S de *M. perniciosa*.

2.3 BIDDING IMMUNOGLOBULIN PROTEIN (BiP)

O gene *BiP* (Binding immunoglobulin Protein) codifica uma chaperona molecular residente no lúmen do retículo endoplasmático (RE). As chaperonas moleculares estão atreladas a tolerância, a fatores de estresses bióticos e abióticos, e mediar na montagem correta de outras proteínas. As chaperonas em sua grande maioria são membros da família HSP (Heat Shock Protein). BiP é uma proteína com aproximadamente 78 kDa pertencente a superfamília HSP70 (HAAS;MEO, 1988) que desempenha um papel importante na translocação de proteínas, regulação de processos no RE como dobramento de proteínas recém sintetizadas, direcionamento de proteínas deformadas para degradação e proteção celular em condições de estresse (HAMMOND & HELENIUS, 1995; GALILI et al., 1998; VITALE & DENECKE, 1999).

As proteínas BiP são altamente conservadas e uma das mais bem caracterizadas do RE. Essas caracterizações permitiram estudos mais eficientes acerca do papel e funcionalidade dessa família de proteínas em plantas. Muitos genes que codificam para essas proteínas BiPs, e que estão envolvidos na alteração de processos que ocorrem no RE em decorrência de situações de estresse, tem sido identificados. Com cinco genes em eucalipto, cinco genes em tabaco, três genes em *Arabidopsis*, um gene em *Citrus*, quatro genes em soja sendo eles SoyBiPA, SoyBiPB, SoyBiPC e SoyBiPD e pelo menos dois em milho (DENECKE et al., 1991; WROBEL et al., 1997; CASCARDO et al., 2000, 2001; CAGLIARI et al., 2005; FIETTO et al., 2007).

Plantas em condições de estresse aumentam a síntese de proteínas como resposta de defesa. O acúmulo de proteínas mal dobradas no RE, irá provocar uma resposta da célula conhecida como resposta à proteína mal dobrada (UPR), que irá sinalizar a indução de chaperonas moleculares, incluindo BiP, uma das principais chaperonas induzidas (GETHING, 1999). Em condições normais, a BiP é sintetizada em baixos níveis na planta, o aumento da atividade secretora e condições de estresses que culminam no acúmulo de proteínas maldobradas dentro do RE fazem com que sua síntese seja acentuadamente induzida, já que a formação de agregados insolúveis podem tornar-se tóxicos para a célula (GETHING;SAMBROOK, 1992). Altos níveis de expressão de BiP são essenciais para a sobrevivência celular estando relacionadas a proteção da planta contra danos celulares sob condições de estresse (BOSTON et al., 1996; PEDRAZZINI & VITALE, 1996).

A proteína BiP e homólogos pertencentes a família HSP70 possui dois domínios funcionais com função ATPase: um domínio de ligação ao nucleotídeo (NBD) na porção amino-terminal e um domínio de ligação ao substrato (SBD) na porção carboxi-terminal. A atividade da proteína BiP é regulada pela atividade ATPase no domínio NBD, onde a hidrólise do ATP irá ocasionar a ligação e liberação ao substrato no domínio SBD (KNARR et al., 2002). Quando o ATP se liga ao domínio amino-terminal, a “tampa” do SBD é aberta, essa mudança na conformação do SBD gera uma redução da afinidade ao substrato. Após a hidrólise do ATP, o ADP é ligado ao domínio NBD e o domínio SBD assume a conformação fechada altamente associada ao substrato, isso cria uma baixa taxa de interrupção para a ligação de substrato de alta afinidade promovendo dobramentos mais eficientes. A troca de ADP por ATP resulta na abertura da tampa no domínio SBD e subsequente, liberação do substrato (SCHMID et al., 1994; BUKAU & HORWICH, 1998; FIETTO et al., 2007).

Diversos trabalhos descrevem a superexpressão desse gene em plantas que respondem a uma variedade de condições de estresses abióticos e bióticos. Além disso, níveis elevados de BiP foram associados a melhor resposta da planta a estresse nutricional, aclimação ao frio e elicitores de resposta a patogênese em plantas (CASCARDO et al., 2000; VALENTE et al., 2009). A superexpressão do gene BiP conferiu tolerância a plantas de *Nicotiana tabacum* submetidas ao estresse hídrico (ALVIM et al., 2001). Também foi verificado influenciando na qualidade dos grãos, auxiliando na síntese e armazenamento do amido em arroz (YASUDA et al., 2009).

Outro estudo indicou a adaptação da planta de soja (*Glycine max* L. Merr.) a recuperação de ferimentos causados pela mosca branca, onde foi observado uma superexpressão acentuada dos níveis de mRNA de BiP nas folhas atacadas. O estudo ainda observou níveis diferenciados de acúmulo de BiP em plantas de soja em diferentes órgãos como folhas, cotilédones, vagens e sementes, onde indicaram que BiP não é constitutivamente expressa em órgãos vegetais terminalmente diferenciados (KALINSKI et al., 1995). Um estudo mais recente mostrou que a regulação negativa de BiP em plantas de tomate resultou no comprometimento na tolerância ao patógeno fúngico vascular *Verticillium dahliae* (LIEBRAND et al., 2014). Apesar de todos os estudos mostrarem a relação do gene BiP no armazenamento de proteínas de reserva e na resposta a estresses bióticos e abióticos, estudos mais

aprofundados relacionando a superexpressão do gene utilizando a engenharia genética com o intuito de conferir tolerância ao ataque de patógenos fúngicos, bem como na interação do gene BiP em resposta ao fitopatógeno *M. perniciosa* ainda não foram explorados.

3. HIPÓTESE

A superexpressão do gene *soyBiPD* em plantas transgênicas de tomate pode exercer um importante papel na resposta pela infecção do fungo *M. perniciosa* e ataque de mosca branca.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a funcionalidade do gene *soyBiPD* em conferir tolerância à estresse biótico, em plantas geneticamente modificadas de *Solanum lycopersicum*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Caracterizar *in silico* família gênica de BiP em *Solanum lycopersicum* e *Theobroma cacao*;
- ii. Obter plantas transformadas superexpressando o gene *soyBiP* em *Solanum lycopersicum*;
- iii. Analisar a resposta das plantas inoculadas com o fungo *M. perniciosa* e ataque de mosca branca;
- iv. Obter e comparar o perfil proteico de plantas transformadas e não transformadas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISES IN SÍLICO DOS GENES BIPS DE TOMATE E CACAU

A identificação dos genes BiPs de tomate e cacau foi realizada por tBLASTN, utilizando como referência as sequências de genes BiPs já caracterizados em soja (*Glycine Max*) segundo (CASCARDO et al.,2000) explorando o genoma de referência de *Solanum lycopersicum* (versão do genoma 2.4) e *Theobroma cacao* (versão do genoma 1.1) disponíveis nos bancos de informação genômica do Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) bem como informações sobre estrutura exon-íntron e sequências de aminoácidos preditas para cada gene BiP.

Para predição da localização subcelular das proteínas, foi utilizado o banco de dados Wolf Psort (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>). As análises de massa molecular (mW), ponto isoelétrico (pI), GRAVY (índice de hidropaticidade) e tamanho dos polipeptídios das sequências de aminoácidos foram preditos empregando-se o conjunto de ferramentas disponíveis no PROTPARAM (<http://web.expasy.org/protparam/>). As estruturas exón/íntron foram construídas utilizando o Exon-Intron Graphic Maker (<http://wormweb.org/exonintron>) (Figura 4).

As sequências foram submetidas a múltiplos alinhamentos por meio da plataforma Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), e as regiões de domínios e sítios ativo conservados foram identificadas com o auxílio do banco de dados InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Para identificação de peptídeo sinal foi utilizado o SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e na busca por sequências do tipo KDEL/HDEL foi utilizado o programa ERPred (<http://proteininformatics.org/mkumar/erpred/>). Essas sequências são características de proteínas que são passíveis de serem encontradas no retículo endoplasmático.

5.2 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS TRANSGÊNICAS DE TOMATE

5.2.1 Material vegetal

Foram utilizadas sementes de tomateiros variedade Micro-Tom. As sementes foram desinfestadas via imersão em hipoclorito de sódio a 1%, contendo tween 20, por 20 minutos, seguido de 3 lavagens com água destilada autoclavada. As sementes foram transferidas para caixas de micropropagacao contendo 30 mL de meio MS sólido (MURASHIGUE & SKOOG, 1962). O material permaneceu em

sala de crescimento a 25° C, com fotoperíodo de 16h luz/ 8h escuro com intensidade luminosa de 32 μ moles fotons/m/seg por 15 dias.

5.2.2 Vetor de transformação

Uma sequência de cDNA, *soyBiPD*, que codifica a proteína BiP (n.º de acesso AF031241 no GenBank) foi excisada do clone pUFV42, cedido por Alvim e colaboradores (2001), com *Xba*I e inserido no vetor pB35SdAMVNOS2. A sequência foi clonada sob o controle do promotor CaMV35S (vírus do mosaico da couve-flor), com a sequência *enhancer* do vírus do mosaico da alfafa e como terminação o sinal de poliadenilação 3' do gene da nopalina sintase (*nos*) (Figura 2). O vetor resultante, denominado pUFV42, foi inserido, via eletroporacao, em *Agrobacterium tumefaciens* estirpe EHA 105 (ALVIM et al., 2001).

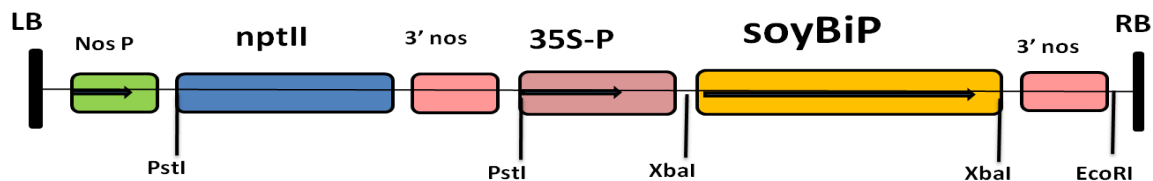


Figura 2. Construção utilizada para transformação genética do tomate variedade Micro-Tom. Vetor pUFV42, o gene *soyBiP* no sentido senso sob controle do promotor constitutivo contendo CAMV35S e do sinal de poliadenilação (3' nos). LB e RB correspondem às bordas esquerda e direita do T-DNA, respectivamente. Adaptado de (ALVIM et al., 2001).

5.2.3 Transformação genética de *Solanum lycopersicum* via *Agrobacterium tumefaciens*

Após o período de 15 dias de germinação das sementes, segmentos de hipocótilo e cotilédones dos tomateiros, com $\cong$ 1 cm, foram excisados e imersos em suspensão de *A. tumefaciens* contendo plasmídeo pUFV42. A bactéria foi previamente crescida por 48 h a 28° C e 220 RPM em 50 mL de meio YEP acrescido dos antibióticos canamicina (50mg/L) e estreptomicina (100mg/L). Após esse período, o meio foi centrifugado a 14000 RPM e o precipitado foi ressuspendido em meio MS líquido com a OD₆₀₀ ajustada para 0,5. Os explantes de tomate ficaram imersos nessa suspensão, sob leve agitação, por 15 minutos.

Após a incubação, os explantes foram transferidos para placas de Petri contendo papel filtro esterilizado para remoção do excesso da *A. tumefaciens*. Sendo posteriormente transferidos para placas de Petri contendo 20 mL de meio de co-cultivo (Sais de MURASHIGE & SKOOG, 1962, suplementado com 2,4-D [0.2 mg.l⁻¹], acetoseringona [100 mM], 30g/L de sacarose e 8g/L de agar). O material foi mantido no escuro a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 2 dias. Após este período, os explantes foram transferidos para o meio de regeneração (Sais de Murashige e Skoog, 1962) acrescido de vitaminas nish, os reguladores de crescimento ácido indol acético - AIA [1 mg.L⁻¹], zeatina (0.5 mg.L⁻¹) e os antibioticos timentin [300 mg.L⁻¹] e canamicina [100 µg mL⁻¹] como agente de seleção. Os explantes regenerados foram subcultivados para meio de Alongamento (Sais de Murashige e Skoog, 1962) contendo timentim [300 mg.L⁻¹] e canamicina [100 µg mL⁻¹], e posteriormente, enraizados em meio isento de fitohormônio contendo canamicina [100 µg mL⁻¹]. As plântulas (T0) com sistema radicular desenvolvido foram aclimatizadas e transferidas para vasos plásticos de 1L contendo substrato (plantmax) e mantidas em casa de vegetação, cultivadas sob condições padronizadas com irrigação, luz e temperatura controladas até a produção de sementes.

5.2.4 Análise das plantas transgênicas por PCR

O DNA genômico das plantas transgênicas e controles (não transformadas) foram extraídos via método do CTAB (DOYLE & DOYLE, 1990) a partir de 50mg de folhas isoladas das plantas mantidas em casa de vegetação. O diagnóstico molecular da transgenia foi realizado via a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) empregando-se oligonucleotídeos específicos. A reação de PCR foi conduzida utilizando pares de primers para o gene de seleção, nptII (neomicina fosfotransferase, gene que confere resistência à canamicina). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados foram: nptII-F (5'-ATGGGGATTGAACAAGATGGATTG-3') e nptII-R (5'- TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGC-3').

Foi realizada a amplificação empregando 0,5 µL de DNA [50-100 ng], 0,5 µL de dNTPs [2,5 mM], 0,5 µL de MgCl [25 mM], 1,25 µL de tampão (10x), 0,5 µL 10µM dos oligonucleotídeos específicos e 0,1 µL de Taq Polimerase [5U/µL] em volume de reação de 12 µL. As reações foram amplificadas em termociclador (APPLIED BIOSYSTEMS), com uma desnaturação inicial de 95 °C por 4 min seguida de 35

ciclos de 94 °C por 1 min, 58 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e 30 segundos e uma extensão final de 72°C por 10 min. O PCR foi avaliado via eletroforese do produto em gel de agarose (1%) contendo gel red diluído a 1:1000 (1 µl de GelRed™ para 1000 µl de água miliQ) e fotografado em luz UV.

5.3 1D-SDS-PAGE E *immunoblotting*

Para a extração das proteínas, foram utilizadas 0,4 g do material vegetal foliar fresco (terceira folha completamente expandida das plantas) que estavam na casa de vegetação. Após a coleta, as folhas foram imediatamente maceradas na presença de nitrogênio líquido. Foram extraídas proteínas de plantas não transformadas (NT controle) e das 8 linhagens transgênicas L2, L3, L4, L5, L8, L9, L10 e L12. As proteínas foram extraídas seguindo o protocolo descrito por (PIROVANI et al., 2008). O precipitado final foi ressuscitado em 800 µL de tampão de reidratação (6M de uréia, 2M de tiourea, CHAPS 2 %) e estocado a -20°C até o uso. A quantificação proteica foi realizada utilizando o 2-D Quant Kit de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare). A qualidade e quantidade das proteínas foram monitoradas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) 12,5 %, onde 30 µg de cada amostra foram diretamente aplicados no gel, em minicubas HOEFER SE260 Mighty Small (LAEMMLI, 1970). Os géis produzidos mediram 8 x 10 cm e foram corados com Coomassie blue.

Para analisar o acúmulo de BiP na planta controle e linhagens transgênicas (T2), foi realizada um SDS-PAGE utilizando 30 µg do extrato proteico de cada amostra em mini-gel vertical de poliacrilamida 12,5 % e 30 mA durante 4 h. Posterior à corrida, o mini-gel foi imerso em solução de fixação (etanol 40 % e ácido acético 10 %) onde permaneceu por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida o gel foi transferido para solução de coloração contendo Coomassie Blue. O gel ficou 12 horas corando, sob suave agitação. Após esse período, o gel foi descorado via lavagens com água revelando as proteínas. O gel foi escaneado em Labscanner (Amersham Bioscience).

Para o immunoblotting, após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (BIO-RAD, com poro de 0,45 µm) com amperagem em 0,8mA/cm², por duas horas. A transferência proteica foi bloqueada via imersão da membrana por 1h em solução de leite em pó (2,5 %) em TBS-1x (20 mM de Tris-

HCl, pH 7,6, 0,8 % de NaCl e 0,1 % de Tween 20). Após o bloqueio a membrana foi lavada por 3 vezes de 15 min com TBS 1X e transferidas para solução de TBS 1X contendo o anticorpo policlonal anti-BiP (diluição 1:2000). Após 1h, sob suave agitação, a membrana sofreu mais três lavagens com intervalo de 15 min com tampão TBS-1x. A membrana foi então incubada com o anticorpo secundário, anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma, diluição 1: 2000) por 2 h. Após essa etapa, foram realizadas outras três lavagens com duração de 15 minutos a cada lavagem com o tampão TBS-1x. A membrana foi incubada por 15 minutos com 40 mL-1 de tampão de revelação (5 mM de MgCl, 100mM de Tris-HCl, pH 9,8 e H₂O). A revelação foi feita utilizando os substratos NBT/BCip.

5.4 INOCULAÇÃO E AVALIAÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS A *M. pernicios*

As progênes T0 e T1 foram semeadas até chegar a progênie T2 onde a homozigose do transgene nas plantas foram obtidas. Sementes de tomateiro Micro-Tom não transformadas (NT) e transgênicas (T2) linhagens (L2, L4, L9, L10 e L12) foram semeadas e após 5 dias de germinação, transferidas para vasos plásticos de 1L contendo substrato (plantmax). Decorridos 15 dias após a germinação, as plantas foram inoculadas com esporos de *M. pernicios*, onde foram inoculadas quatro repetições de cada linhagem. O procedimento para inoculação foi realizado de acordo com (FERREIRA, 2016). No dia da inoculação, as folhas foram reduzidas a 1/3 do seu tamanho (Figura 3-A) e cada planta recebeu 20 µL da suspensão (de Agar contendo 3×10^5 esporos/mL e 5×10^5 esporos/mL do inóculo da espécie hospedeira *Solanum stipulaceum* Willd ex. Roem & Shult. (Caiçara)). Os esporos foram cedidos da CEPLAC do banco de dados de basidiósporos (CGEN). Foram depositados sobre o meristema apical de cada planta (Figura 3-B). O inóculo utilizado foi testado previamente possuindo germinação superior a 80%. Quatro plantas não transformadas (NT) e transgênicas (T2) linhagens L2, L4, L9, L10 e L12 foram inoculadas com 20µl de uma solução água-agar. Após a inoculação, todas as plantas foram acondicionadas dentro de sacos plásticos borrifados com água e contendo algodão molhado no seu interior (Figura 3-C). As plantas foram mantidas nessa câmara úmida por 48 horas, sob temperatura constante de 25°C, e umidade relativa de 97%. Posteriormente, os vasos contendo as plantas foram levados para a

casa de vegetação onde permaneceram até o final do experimento. O delineamento foi inteiramente casualizado, sendo 4 repetições das plantas para cada linhagens transgênicas e plantas (NT).

Quinze dias após a inoculação, as plantas de tomateiro Micro-Tom começaram a ser avaliadas quanto a possível infecção do *Moniliophthora perniciosa*. As análises foram realizadas em intervalos de seis a dez dias. Observou-se os sintomas característicos da doença (hiperplasia, hipertrofia, brotação lateral). As plantas tiveram a altura, distancia entre a base e o meristema apical, medida com o auxilio de uma régua. Avaliou-se também o número de flores, frutos e sementes formadas. A idade das plantas no momento da floração também foi anotada. As avaliações foram realizadas no tempo 0, 15, 20, 30, e 45 dias após a inoculação. Os dados foram submetidos a análises de homogeneidade de variância de Levene, onde os dados de altura e diâmetro foram tratados como paramétricos e flor e fruto como não paramétricos.

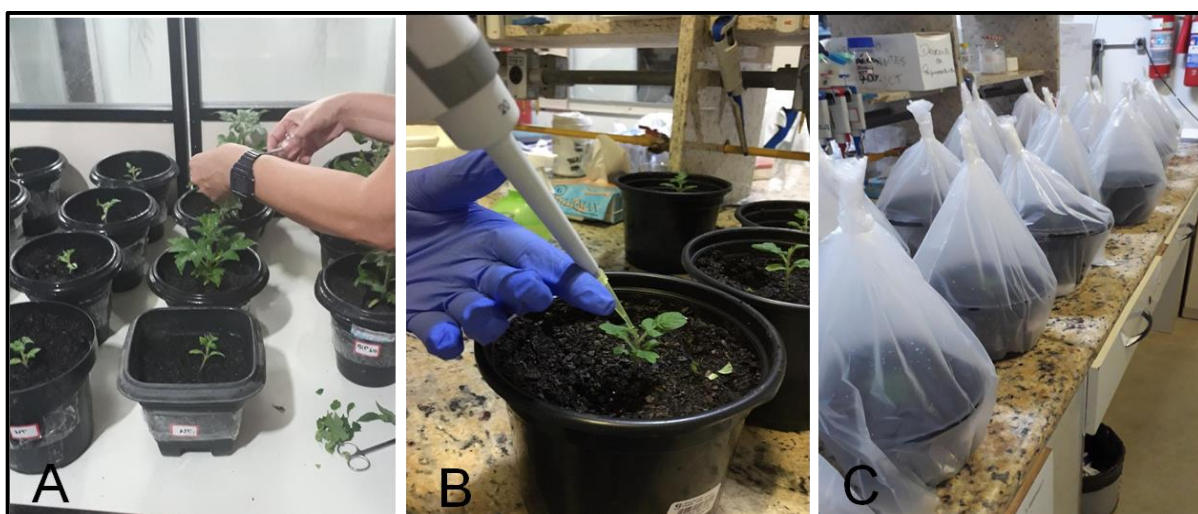


Figura 3. Procedimentos de inoculação. A: Secção das folhas em 50% do tamanho; B: deposição da gota com suspensão de basidiósporos; C: acondicionamento das plantas em sacos plásticos com água.

5.5 ACÚMULO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)

Discos foliares das plantas controle (NT) e das linhagens transgênicas (L2, L4, L9 e L12) sem submissão ao estresse, e de plantas (NT) e linhagens transgênicas (L2, L4, L9 e L12) oriundas do experimento de inoculação com *M. perniciosa*, 15 dias após a inoculação, foram submetidas à coloração histoquímica com DAB-HCL (3,3' – diaminobenzidina). De cada planta analisada foram isolados 6 discos foliares da terceira folha completamente extendida. As amostras foram

imediatamente submetidas a infiltração a vácuo com 1 mg mL⁻¹ de DAB-HCl pH 3,8, por 30 minutos, e posteriormente, deixadas por 24 horas no escuro em temperatura ambiente. Em seguida, os discos foliares foram mantidos imersos em etanol 90%, fervidos por 20 minutos. Posteriormente os discos foram lavados com etanol 50% até que toda clorofila fosse retirada. Os discos foliares foram fotografados em lupa (Leica EZ4) com aumento de 4x. A intensidade da coloração marrom indica o teor de peróxido de hidrogênio presente no material. O tratamento controle da metodologia consistiu na infiltração nos discos foliares de uma solução de água e HCl com pH 3,8 seguida das lavagens com álcool.

5.6 COLETA DE FRUTOS DE PLANTAS TRANSGENICAS E NÃO TRANSFORMADAS SOB ATAQUE DA MOSCA BRANCA (*Bemisia tabaci*)

No período em que a casa de vegetação estava sob infestação de mosca branca (*Bemisia tabaci*), foram feitas coletas de frutos das plantas NTs e linhagens transformadas T2 (L2, L4, L9, L10 e L12) no estágio final de maturação que estavam sob estresse, foram contabilizados número de frutos e sementes, sendo quatro repetições de planta para cada linhagem transgênicas e plantas (NT). Os dados foram submetidos a análises estatísticas de variância (ANOVA) e comparação de medidas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.7 OBTENÇÃO E COMPARAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO DE PLANTAS TRANSFORMADAS E NÃO TRANSFORMADAS

5.7.1 Obtenção das proteínas

Para a extração das proteínas, foi utilizada 0,4 g do material vegetal foliar fresco (terceira folha completamente expandida das plantas) que estavam na casa de vegetação. Após a coleta, as folhas foram imediatamente maceradas na presença de nitrogênio líquido. Foram extraídas proteínas de plantas não transformadas (NT controle) e de plantas representativas das linhagens transgênica L2, L4, L9, L10 e L12. As proteínas foram extraídas seguindo o protocolo descrito por (PIROVANI et al., 2008). O precipitado final foi ressuscitado em 800 µL de tampão de reidratação (6M de uréia, 2M de tiourea, CHAPS 2 % e azul de

bromofenol 0,002 %) e estocado a -20°C até o uso. A quantificação proteica foi realizada utilizando o 2-D Quant Kit de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare). A qualidade e quantidade das proteínas foram monitoradas em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) 12,5 %, onde 30 µg de cada amostra foram diretamente aplicados no gel, em minicubas HOEFER SE260 Mighty Small (LAEMMLI, 1970). Os géis produzidos mediram 8 x 10 cm e foram corados com Coomassie blue.

5.7.2 Eletroforese 2D

Para análise proteômica em 2D-SDS-PAGE, foram utilizadas 400 µg de proteína total diluída em 250 µL de solução de reidratação contendo os anfólitos de 3 e 10. As tiras de gel (contendo imobilina) com 13 cm de comprimento com gradiente de pH não linear imobilizado de 3 a 10 (Amersham Biosciences, Immobiline™ Dry-Strip) foram submetidas na unidade de Focalização Isoelétrica EthanIPGphor III e hidratadas por 12 h na solução de tampão de reidratação / proteína. A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida a 12,5 % em um sistema de eletroforese vertical HOEFER SE 600 Ruby (Amersham Bioscience). A corrida começou com uma corrente elétrica de 15 mA / gel por 15 min, seguida de 30 µA / gel por 30 min e 50 µA / gel por 3,5 h, totalizando um tempo de 4,25 horas. Foram preparados géis em triplicatas para cada amostra (NT e L12).

5.7.3 Visualização dos spots e análise de imagens

Após eletroforese, os géis de poliacrilamida foram colocados em tampão de fixação (etanol 40% e ácido acético 10 %) por 1 h; em seguida, o tampão foi substituído por corante coloidal Coomassie Blue (8% de sulfato de amônio, 0,8% de ácido fosfórico, 0,08 % de Coomassie Brilliant Blue G-250 e 20% de metanol) e foram incubados por 5 dias sob agitação suave. O corante foi substituído por água destilada e os géis foram mantidos sob leve agitação, com trocas diárias de água até que o excesso de corante fosse removido. As imagens dos géis foram digitalizadas com um Labscanner (Amersham Bioscience) e analisadas para detecção e quantificação relativa dos spots usando o software ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE HealthCare), considerando a área e a intensidade dos spots. Os géis de

referência das triplicatas foram utilizados para identificar a variação na abundância e distribuição de spots, bem como para comparar o acúmulo relativo de proteínas exclusivas para os diferentes órgãos estudados. As triplicatas dos géis referentes a planta (NT) e (L12) foram comparadas entre si. Para os matches, spots que apresentaram uma mudança relativa na dobra em abundância igual ou maior que 1,5 foram considerados diferencialmente expressos, e a significância estatística foi determinada se ($p < 0,05$) para o teste ANOVA.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS GENES BiP EM *Theobroma cacao* E *Solanum lycopersicum*

Após análise de bioinformática utilizando as sequências dos genes BiP caracterizadas em soja (*Glycine max* L. Merr.) foram identificados dois genes BiPs no genoma de *Theobroma cacao*, aqui designados *TcBiP1* e *TcBiP2* e quatro genes em *Solanum lycopersicum*, denominados *SolBiP1*, *SolBiP2*, *SolBiP3* e *SolBiP4* (Tabela 1). A partir das sequências nucleotídicas foram deduzidas as sequências de resíduos de aminoácidos revelando que *TcBiP1* e *TcBiP2* apresentam resíduos de 665 (73,31 kDa) e 659 (73,03 kDa), respectivamente enquanto as BiPs de tomate apresentaram resíduos variando entre 619 (73,51 kDa - *SolBiP3*) a 669 (74,64 kDa) (Tabela 1). Os BiPs de cacau e tomate apresentaram um ponto isoelétrico (PI) entre 5.07 e 5.95 e escore GRAVY negativo, indicando que todas são proteínas ácidas e hidrofílicas (Tabela 1). As proteínas analisadas apresentaram também predição da localização subcelular no RE esperado para proteínas BiP por serem residentes nessa organela (DENECKE, 1996). Além disso, mostraram a presença de dois domínios conservados e peptídeo sinal na porção N-terminal (Tabela 1).

De fato, sabe-se que os membros da família HSP70, incluindo as BiPs, são altamente conservadas entre os organismos eucariotos. Sendo assim, os resultados obtidos com as análises *in silico* realizadas em tomate e cacau corroboram com os estudos realizados com outras espécies vegetais ao analisar-se a conservação do peso molecular, tamanho da sequência gênica, ponto isoelétrico, presença de peptídeo sinal localizado na região N-terminal e número de domínios conservados,

sendo eles o NBD e SBD (CASCARDO et al., 2000, 2001; FORWARD & MISRA, 2000; CAGLIARI et al., 2005; FIETTO et al., 2007).

Tabela 1: Caracterização dos genes que codificam BiP em cacau *Theobroma cacao* e tomate *Solanum lycopersicum*. GRAVY: índice de hidropaticidade, PI: Ponto Isoelétrico; NI: não identificado.

Espécies	Nome do Gene	Localização	Nº Pares de base	Nº de íntrons	Nº de éxons	P.Molecular	PI	GRAVY	P. sinal	HDEL	Domínios conservados	Localização Subcelular
<i>Theobroma cacao</i>	TcBiP 1	Chr NI	665	6	7	73,315	5.36	-0,444	SIM	SIM	2	RE
	TcBiP 2	Chr NI	659	5	6	73,030	5.95	-0.428	SIM	SIM	2	RE
<i>Solanum lycopersicum</i>	SolBiP 1	Chr 3	667	7	7	74,641	5.07	-0.434	SIM	SIM	2	RE
	SolBiP 2	Chr 8	666	7	8	73,200	5.10	-0.449	SIM	SIM	2	RE
	SolBiP 3	Chr 6	619	8	9	73,513	5.04	-0.389	SIM	SIM	2	RE
	SolBiP 4	Chr 1	669	6	7	74,641	5.36	-0.507	SIM	SIM	2	RE

Foi também analisada a estrutura exón-íntron entre os genes das espécies de cacau e tomate. Esse estudo revelou um padrão similar tanto no número quanto no tamanho das sequências éxônicas e íntronicas (Figura 4). Segundo Wei e colaboradores (2012) o tamanho e posição dos exóns/íntrons fornecem informações importantes quanto à evolução gênica da família. Sendo assim, nossos resultados sugerem que apesar do gene BiP ser altamente conservado e especializado quanto a sua função molecular nas diversas espécies, as diferenças no tamanho e número de íntrons na família HSP70 incluindo BIPs podem indicar alterações por duplicações (ZHU et al., 2014; TANG et al., 2016).

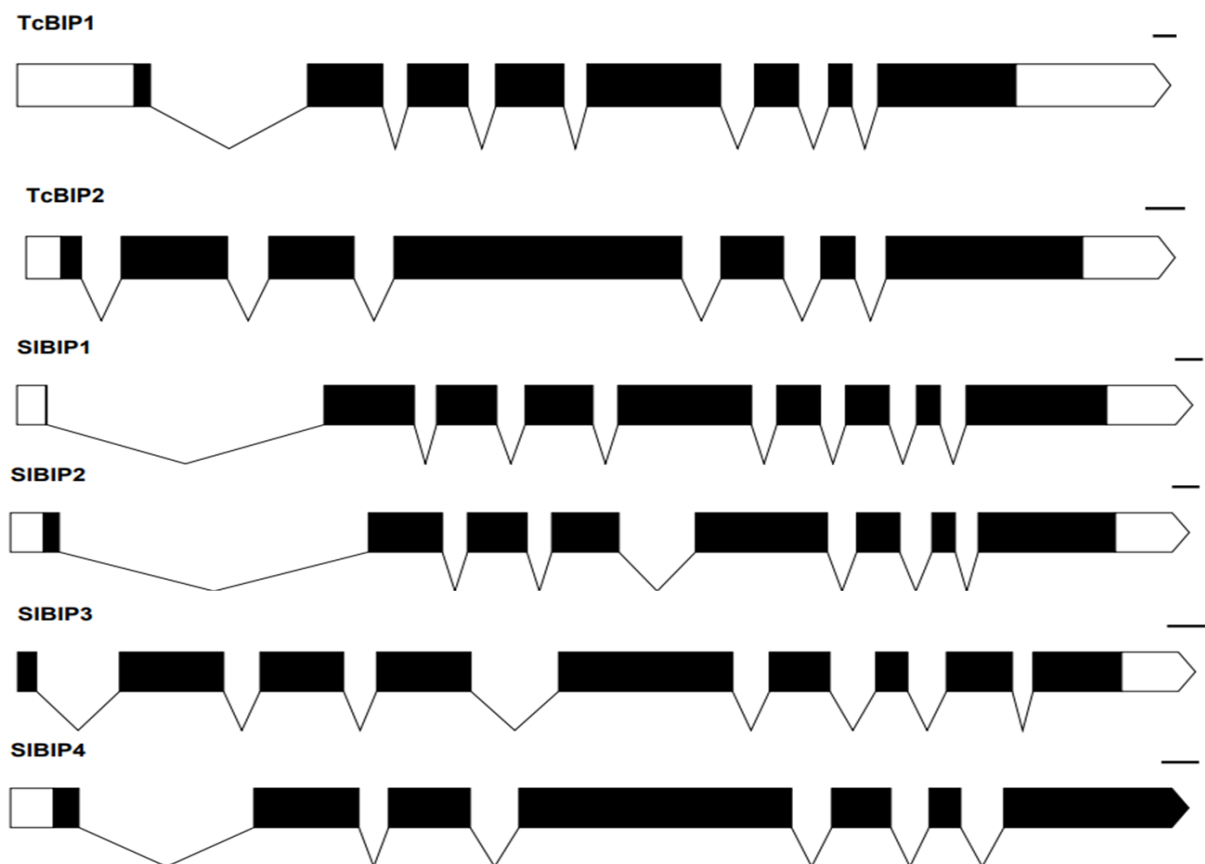


Figura 4. Estrutura de éxon/íntron dos genes BiP de *T. cacao* e *S. lycopersicum*. A caixa preta corresponde ao éxon e a linha corresponde ao íntron.

Como esperado, o alinhamento múltiplo mostrou a presença de dois domínios conservados entre as proteínas BiPs encontradas em cacau (TcBiP1 e TcBiP2), tomate (SolBiP1, SolBiP2 e SolBiP3) e soja já caracterizadas. O domínio (NBD) de ligação ao nucleotídeo que possui atividade de hidrólise de ATP e o domínio de interação ao substrato (SBD). Os domínios proteicos são partes da cadeia polipeptídica que apresentam maior densidade e pode enovelar-se

independentemente, formando uma estrutura compacta e estável. Membros da família HSP70 apresentam principalmente esses dois domínios de função (ENGLISH et al., 2017).

As proteínas BiP possuem características que as diferem de outras pertencentes a família multigênica HSP70, como o sinal de retenção no retículo endoplasmático HDEL. Esse sinal localizado na porção C-terminal também é responsável por promover o seu retorno ao retículo endoplasmático após suas atividades de montagem e endereçamento de proteínas (WANG et al., 2017). Todas as proteínas preditas em cacau e tomate verificadas nesse estudo apresentaram sinais de retenção do RE onde TcBiP1, SolBiP1, SolBiP2 apresentaram sinal HDEL, TcBiP2 sinal TDEL, SolBiP3 sinal DDEL e SolBiP4 sinal YDEL (Figura 5). O sinal de retenção possui variantes funcionais dentro de uma mesma espécie, como os preditos em TcBiP2, SolBiP3 e SolBiP4. Essas variantes foram descritas em outras proteínas que também possuem o sinal de retenção para o retículo endoplasmático (HIJARRUBIA et al., 1997; FORWARD & MISRA, 2000).

SolBiP4_	--AEKKQKQNLGTVIGIDLGT	TYSCVGVYK--ENNVEIIAND	QGNRITPSWVAFTDTERL	57	SolBiP4_	HLGGEDFDHKLMDYFIKLIK	RKYSKDISDDKALGKLR	EECEAKRALSNQHQRVEIES	293
TcBiP2_	-----DETKVGTVIGIDLGT	TYSCVGVYK--GHVEIIAND	QGNRITPSWVAFTDTERL	52	TcBiP2_	HLGGEDFDHRVMDYFIKLIK	KYKNDISKDNKALGKLR	EECEAKRALSSQHQRVEIES	287
SolBiP3_	---NEEASKLGTVIGIDLGT	TYSCVGVYK--GHVEIIAND	QGNRITPSWVSFTDGERL	54	SolBiP3_	HLGGEDFDH-----GVIK	KKHKGKDISKDNRALGKLR	EEAERAKRSLSSQHQRVEIES	280
SolBiP1_	FSIAKEEATKLGTVIGIDLGT	TYSCVGVYK--GHVEIIAND	QGNRITPSWVAFTDGERL	58	SolBiP1_	HLGGEDFDQQRVMEYFIKLIK	KKHKGKDISKDNKALGKLR	EEAERAKRALSSQHQRVEIES	294
SolBiP2_	---KEEATKLGTVIGIDLGT	TYSCVGVYK--GHVEIIAND	QGNRITPSWVAFTDNERL	54	SolBiP2_	HLGGEDFDQQRIMEYFIKLIK	KKHKGKDISKDNRALGKLR	EEAERAKRSLSSQHQRVEIES	290
TcBiP1_	---KEEATKLGTVIGIDLGT	TYSCVGVYK--GHVEIIAND	QGNRITPSWVAFTDNERL	54	TcBiP1_	HLGGEDFDHRIMEYFIKLIK	KKHKGKDISKDNRALGKLR	EEAERAKRALSSQHQRVEIES	290
soyBiP1_	---KEEATKLGTVIGIDLGT	TYSCVGVYK--GHVEIIAND	QGNRITPSWVAFTDSERL	54	soyBiP1_	HLGGEDFDQQRIMEYFIKLIK	KKHKGKDISKDNRALGKLR	EEAERAKRALSSQHQRVEIES	290
soyBiP2_	ISIAKEEATKLGTVIGIDLGT	TYSCVGVYK--GHVEIIAND	QGNRITPSWVAFTDSERL	58	soyBiP2_	HLGGEDFDQQRIMEYFIKLIK	KKHKGKDISKDNRALGKLR	EEAERAKRALSSQHQRVEIES	294
soyBiP3_	---MAGKGGPAIGIDLGT	TYSCVGVWQ--HDRVEIIAND	QGNRTTSPSYVGFDTTERL	53	soyBiP3_	HLGGEDFDNRMVNHVFQEF	KRKNKKDISGNPRALRLR	EEAERAKRTLSSTAQTIEIDS	292
soyBiP4_	---MAKKYEGCAVGIDLGT	TYSCVAVWLEOHRVEIIHND	QGNNTTPSCVAFDTERL	55	soyBiP4_	HLGGEDFDNRMVNYFVQEF	KRKNKVDISGNPRALRLR	EEAERAKRTLSYAFTTIEVDA	294
SolBiP4_	IGEAANKQAALNPRTIYDV	KRLIGRKFDDEPQVKIIKML	PFNVVNKAG-KPHVEVVIKE	116	SolBiP4_	LFDGVDFSEPLTRARFEEL	NMDLFKKTMGPVKKALE	DANLKKTDIDELVLVGGSTRIPKV	353
TcBiP2_	IGEAANKQAALNAERTIFDV	KRLIGRKFDDEPQVDIKFL	PLYKVVNKDG-KPYIQVKV-	110	TcBiP2_	LFDGVDFSEPLTRARFEEL	NMDLFKKTMGPVKKALE	DANLKKTDIDELVLVGGSTRIPKV	347
SolBiP3_	IGEAANKLAAVNPRTIFDV	KRLIGRKFDREVQDMKLV	PKIVNTDG-KPYIQVKIKD	113	SolBiP3_	LFDGVDFSEALTRARFEEL	NNDLFRKTMGPVKKAME	DAGLGKNQIDELVLVGGSTRIPKV	340
SolBiP1_	IGEAANKQAAVNPRTIFDV	KRLIGRKFDKEVQDMKLV	PKIVNKDG-KPYIQVKIKD	117	SolBiP1_	LFDGVDFSEPLTRARFEEL	NNDLFRKTMGPVKKAME	DAGLGKNQIDELVLVGGSTRIPKV	354
SolBiP2_	IGEAANKLAAVNPRTIFDV	KRLIGRKFDKEVQDMKLV	PKIVSKDG-KPYIQVKIKD	113	SolBiP2_	LFDGTDFSEPLTRARFEEL	NNDLFRKTMGPVKKAME	DAGLGKNQIDELVLVGGSTRIPKV	350
TcBiP1_	IGEAANKQAAVNPRTIFDV	KRLIGRKFDKEVQDMKLV	PKIVNKDG-KPYIQVKIKD	113	TcBiP1_	LFDGIDFSEPLTRARFEEL	NNDLFRKTMGPVKKAME	DAGLEKRNQIDELVLVGGSTRIPKV	350
soyBiP1_	IGEAANKLAAVNPRTIFDV	KRLIGRKFDKEVQDMKLV	PKIVNKDG-KPYIQVKIKD	113	soyBiP1_	LFDGVDFSEPLTRARFEEL	NNDLFRKTMGPVKKAME	DAGLGKNQIDELVLVGGSTRIPKV	350
soyBiP2_	IGEAANKQAAVNPRTIFDV	KRLIGRKFDKEVQDMKLV	PKIVNKDG-KPYIQVKIKD	117	soyBiP2_	LFDGVDFSEPLTRARFEEL	NNDLFRKTMGPVKKAME	DAGLGKNQIDELVLVGGSTRIPKV	354
soyBiP3_	IGDAKNQVAMNPINTVFD	AKRLIGRRFSDSSVQSDIK	LWPFKVIAGAADKPMIVNY-K	112	soyBiP3_	LYEGIDFYSTVTRARFEEL	NMDLFRKCMFVEKCLRD	AKMDKRSVDDVVLVGGSTRIPKV	352
soyBiP4_	IGEAANKQAATNPENTVFD	AKRLIGRKFSDPVIQKDK	MWLFPKVVAGINDKPMISLNY-K	114	soyBiP4_	LFQGVDFCSSITRAKFEEL	INMELFEECMETVDRCL	SDANMDKSSVHDVVLVGGSTRIPKV	354
SolBiP4_	GDVKVFSPEEISAMILQ	KMKETAAYLGKSIKHAVIT	VPAYFNDAQRQATKDAGTIAGLN	176	SolBiP4_	QQLLKDFFDGKEPNKGVN	PDNAVAYGAAIQGAIL	GGEGGEETKDILLDVLPLSLGIETV	413
TcBiP2_	GETKVFSPEEISAMVLT	KMKETAAYLGKKIKDAVIT	VPAYFNDAQRQATKDAGTIAGLN	170	TcBiP2_	QQLLKDFFDGKEPSKGIN	PDNAVAYGAAVQGGIL	SGEGGEETKDILLDVLPLSLGIETV	407
SolBiP3_	GENKVFSPPEISAMIL	TKMKETAAYFLGKKIND	AVVTVPAYFNDAQRQATKDAGVIAGLN	173	SolBiP3_	QQLLKDFFDGKEPSKGVN	PDNAVAYGAAVQGGIL	SGEGGEETKDILLDVLPLSLGIETV	400
SolBiP1_	GETKVFSPEEISAMIL	VKMKETAAYFLGKTIK	DAVTVPAYFNDAQRQATKDAGVIAGLN	177	SolBiP1_	QQLLKDFFDGKEPSKGVN	PDNAVAYGAAVQGGIL	SGEGGEETKDILLDVLPLSLGIETV	414
SolBiP2_	GEVKVFSPEEISAMIL	TKMKETAAYFLGKTIK	DAVTVPAYFNDAQRQATKDAGVIAGLN	173	SolBiP2_	QQLLKDFFDGKEPSKGVN	PDNAVAYGAAVQGGIL	SGEGGEETKDILLDVLPLSLGIETV	410
TcBiP1_	GETKVFSPEEISAMVLT	KMKETAAYFLGKKIK	DAVTVPAYFNDAQRQATKDAGIAGLN	173	TcBiP1_	QQLLKDFFDGKEPNKGVN	PDNAVAYGAAVQGGIL	SGEGGEETKDILLDVLPLSLGIETV	410
soyBiP1_	GETKVFSPEEISAMIL	TKMKETAAYFLGKKIND	AVVTVPAYFNDAQRQATKDAGVIAGLN	173	soyBiP1_	QQLLKDFFDGKEPNKGVN	PDNAVAYGAAVQGSIL	SGEGGEETKDILLDVLPLSLGIETV	410
soyBiP2_	GETKVFSPEEISAMV	LKMKETAAYFLGKKIND	AVVTVPAYFNDAQRQATKDAGVIAGLN	177	soyBiP2_	QQLLKDFFDGKEPNKGVN	PDNAVAYGAAVQGSIL	SGEGGEETKDILLDVLPLSLGIETV	414
soyBiP3_	GEKQFAAEEISSMVL	IKMREIAEAYLGSTV	KNAVTVPAYFNDSORQATKDAGVIAGLN	172	soyBiP3_	QQLLKDFFDGKEPNKGVN	PDNAVAYGAAVQGSIL	SGEGGEETKDILLDVLPLSLGIETV	414
soyBiP4_	GQEKHLLAEVSSMVL	IKMREIAEAYLET	FPVENAVTVPAYFNDSORQATKDAGVIAGLN	174	soyBiP4_	QQLLKDFFDGKEPNKGVN	PDNAVAYGAAVQGSIL	SGEGGEETKDILLDVLPLSLGIETV	414
SolBiP4_	VVRIINEPTAAAIAYGL	DKKG---KEQNILVYDLGG	TFDVSILSIDNGVFEVLATNGNT	233	SolBiP4_	QQLLKDFFDGKEPNKGVN	PDNAVAYGAAVQGSIL	SGEGGEETKDILLDVLPLSLGIETV	414
TcBiP2_	VARIINEPTAAAIAYGL	DKKG---GEKNILVYDLGG	TFDVSILTIDNGVFEVLATSGDT	227	SolBiP4_	EEEE-----AYDEL	-----	638	
SolBiP3_	VARIINEPTAAAIAYGL	DKKG---GEKNILVYDLGG	TFDVSILTIDNGVFEVLATNGDT	230	TcBiP2_	-----E-DEPTDEL	-----	633	
SolBiP1_	VARIINEPTAAAIAYGL	DKKG---GEKNILVYDLGG	TFDVSILTIDNGVFEVLATNGDT	234	SolBiP3_	AGD-----DDEL	-----	594	
SolBiP2_	VARIINEPTAAAIAYGL	DKKG---GEKNILVYDLGG	TFDVSILTIDNGVFEVLATNGDT	230	SolBiP1_	DSS-ED-DDSHDEL	-----	644	
TcBiP1_	VARIINEPTAAAIAYGL	DKKG---GEKNILVYDLGG	TFDVSILTIDNGVFEVLSTNGDT	230	SolBiP2_	EE---E-DDSHDEL	-----	638	
soyBiP1_	VARIINEPTAAAIAYGL	DKKG---GEKNILVYDLGG	TFDVSILTIDNGVFEVLATNGDT	230	TcBiP1_	E---E-DDSHDEL	-----	637	
soyBiP2_	VARIINEPTAAAIAYGL	DKKG---GEKNILVYDLGG	TFDVSILTIDNGVFEVLATNGDT	234	soyBiP1_	SGEED-E-DDSHDEL	-----	641	
soyBiP3_	VARIINEPTAAAIAYGL	DKKATSVGEKNVLI	FDLGGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDT	232	soyBiP2_	EGED-E-DDSHDEL	-----	644	
soyBiP4_	VARIINEPTAAAIAYGL	DKRTDCVEERNIFIF	DLGGGTFDVSLLTIDKDVFOVKATAGNT	234	soyBiP3_	GAAEDDYAAPSG-----	-----	642	
					soyBiP4_	HAEAMQLKQPGAPFKCSGCK		671	

Figura 5. Alinhamento dos domínios de *Glycine max*, *Theobroma cacao* e *Solanum lycopersicum*. Em azul encontram-se os sítios conservados dentro dos domínios, em amarelo são as sequências de sinalização para retenção no retículo endoplasmático.

6.2 PLANTAS TRANSFORMADAS SUPEREXPRESSANDO O GENE *soyBiP* EM TOMATE

Os estudos funcionais de BiP foram conduzidos utilizando plantas de tomate *Microtom* transgênicas, superexpressando *SoyBiP*, como modelo. Inicialmente foram obtidos 11 linhagens regenerantes a partir da transformação, via *A. tumefaciens*, de epicótilos e discos foliares. Inicialmente os transformantes primários (T0) foram selecionados com base na resistência a Canamicina. As plantas regeneradas e as controle (NT) foram aclimatadas e mantidas em casa de vegetação para acompanhamento do seu desenvolvimento. Quando as plantas atingiram uma altura de aproximadamente 15cm, o DNA genômico das folhas foi extraído e a transgenia foi validada via PCR (Figura 6). Observou-se que das 11 linhagens regenerantes apenas 8 foram confirmadas com a incorporação do transgene (L2, L3, L4, L5, L8, L9, L10, L12) (Figura 7). As linhagens transgênicas foram mantidas em casa de vegetação até a coleta das sementes (T1) e (T2) utilizadas nos experimentos posteriores.

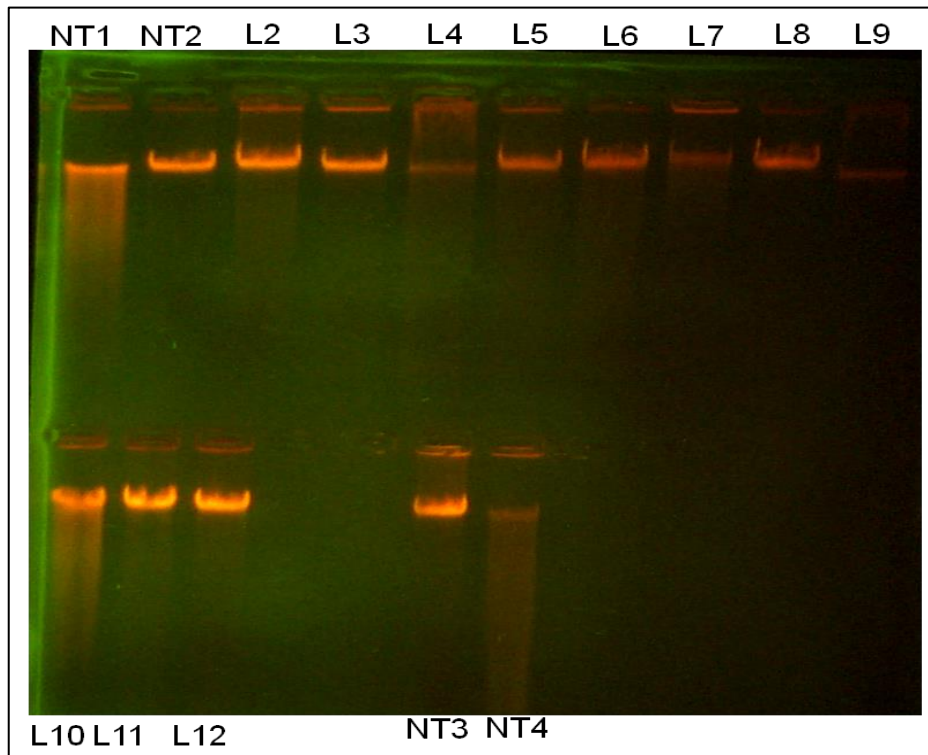


Figura 6. DNA genômico extraído de folhas de *S. lycopersicum* var *Microtom*. 2 microlitros de DNA genômico extraído de folhas de *Microtom* não transformado (NT) e regenerado após transformação via *Agrobacterium* (L2 a L12) foram resolvidos em gel de agarose a 1% e visualizados sob luz ultravioleta.

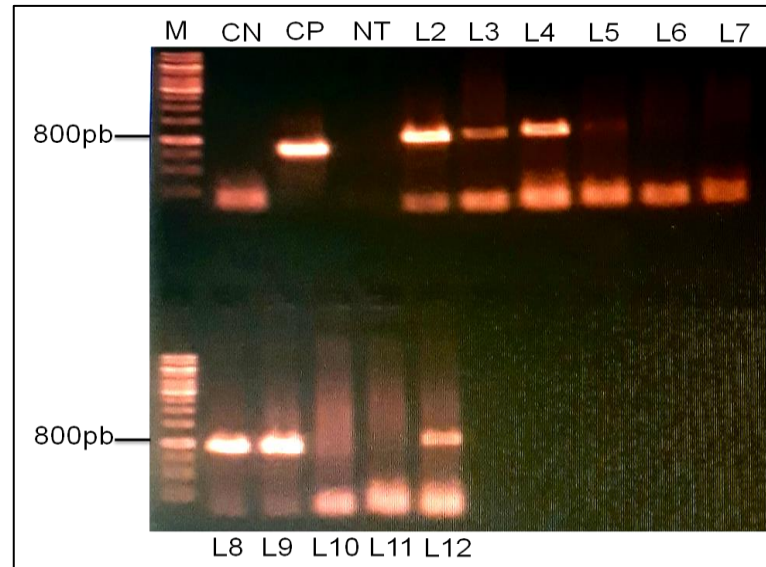


Figura 7. Diagnóstico molecular das plantas de *S. lycopersicum* expressando SoyBiPD. DNA genômico submetido a reação de PCR utilizando primers para *nptII* (Neomicina Fosfotransferase). (M), marcador 1 Kb (CN) Controle negativo- reação sem utilizar DNA molde, (CP) Controle positivo- reação utilizando o vetor pUFV42 como molde, (NT) Planta não transformada, (L2 a L12) linhagens regeneradas *in vitro*. 800pb tamanho esperado do fragmento a ser amplificado.

As análises proteômicas, bioquímicas e moleculares foram realizadas com as plantas da geração T2. A análise do perfil proteico das 8 linhagens transgênicas e das plantas não transformadas (NT) revelou um padrão similar de distribuição das proteínas sendo essas distribuídas entre 14 a 97 kDa. Não foi observado arraste entre as bandas, indicando que a extração foi eficiente em obter um extrato proteico total com proteínas integras e poucos agentes interferentes (Figura 8A). A imunodeteção de BiP, via western blot utilizando anticorpo específico anti-BiP, revelou a presença de uma banda na faixa do 70-78 kDa, condizente com o tamanho esperado para BiP. Essa banda foi revelada nos extratos proteicos de todas as plantas, tanto as não transformadas (NT) como nas linhagens transgênicas. Contudo, observa-se que todas as linhagens transformadas apresentaram acúmulo superior de BiP em comparação com o observado nas plantas controle (NT). No entanto, as linhagens transgênicas L9 e L12 foram as que demonstraram o maior acúmulo da proteína BiP (Figura 8B). Cabe ressaltar que eventos de transformação genética precisam ser analisados de maneira independente visto que o número de cópias do transgene ou o local onde o mesmo se insere no genoma do hospedeiro podem variar (KERESZT et al., 2007). Assim, os diferentes níveis de acúmulo da proteína BiP observados entre as linhagens transformadas pode estar relacionado

com um desses fatores. Visto que o nível de BiP livre no RE de um organismo regula a expressão de *BiP*, sugerimos ainda que pode estar ocorrendo a regulação diferencial da expressão de BiP nas plantas transgênicas, a nível transcrional ou traducional. E que o nível de BiP nas plantas onde o acúmulo do mesmo já é superior (L9 e L12) é possível que a rota de síntese da proteína não mais possa ser ativada como observado em células de mamíferos e plantas (Alvim et al., 2001).

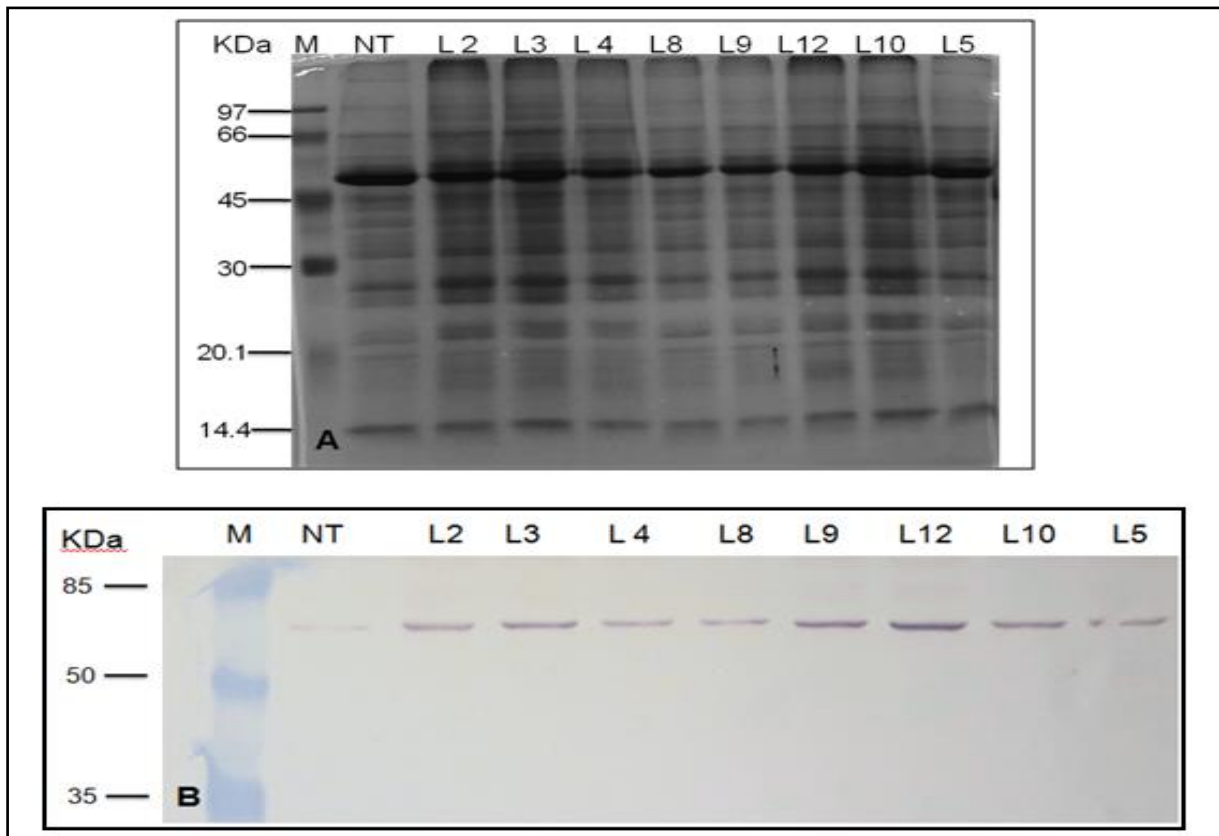


Figura 8. Análise proteica das plantas transgênicas. Trinta microgramas de proteínas totais extraídas de folha de *S. lycopersicum* não transformada (NT) ou transgênica (L2 a L12) foram resolvidas em gel de poliacrilamida e visualizadas após coloração com comassie blue (A). As amostras foram também transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com anticorpo contra BiP (B). M – Marcador de Peso Molecular com peso em kDa indicado.

6.3 AVALIAÇÃO DOS SINTOMAS DE VASSOURA-DE-BRUXA EM TOMATEIROS INOCULADOS COM *M. perniciosa*

As plantas transgênicas e controle foram inoculados com um mix de esporos de *M. perniciosa* visando testar se a supressão de BiP aumenta a tolerância ao ataque do patógeno. Após 15 dias da inoculação, foi possível detectar os primeiros sintomas da doença nas plantas NT, L2 e L4. Os sintomas observados foram hiperplasia e escurecimento do caule (Figura 9). Após 30 dias da inoculação

observou-se que as plantas NT, L2 e L4 começaram a apresentar superbrotação ramificando a partir da área intumescida do caule (Figura 10). Aos 45 dias após a inoculação observou-se que os ramos da brotação se desenvolveram mais (Figura 11). Contudo as linhagens L9, L10 e L12, as que apresentaram maior nível de BiP nas análises de western blot, não apresentaram qualquer sintoma da infecção pelo fungo durante toda análise (Figura 8, 9, 10 e 11). As plantas controle, as que não foram infectadas com os esporos, se desenvolveram normalmente durante todo o período indicando que as mudanças observadas nas NT, L2 e L4 estavam relacionadas com a infecção pelo patógeno.

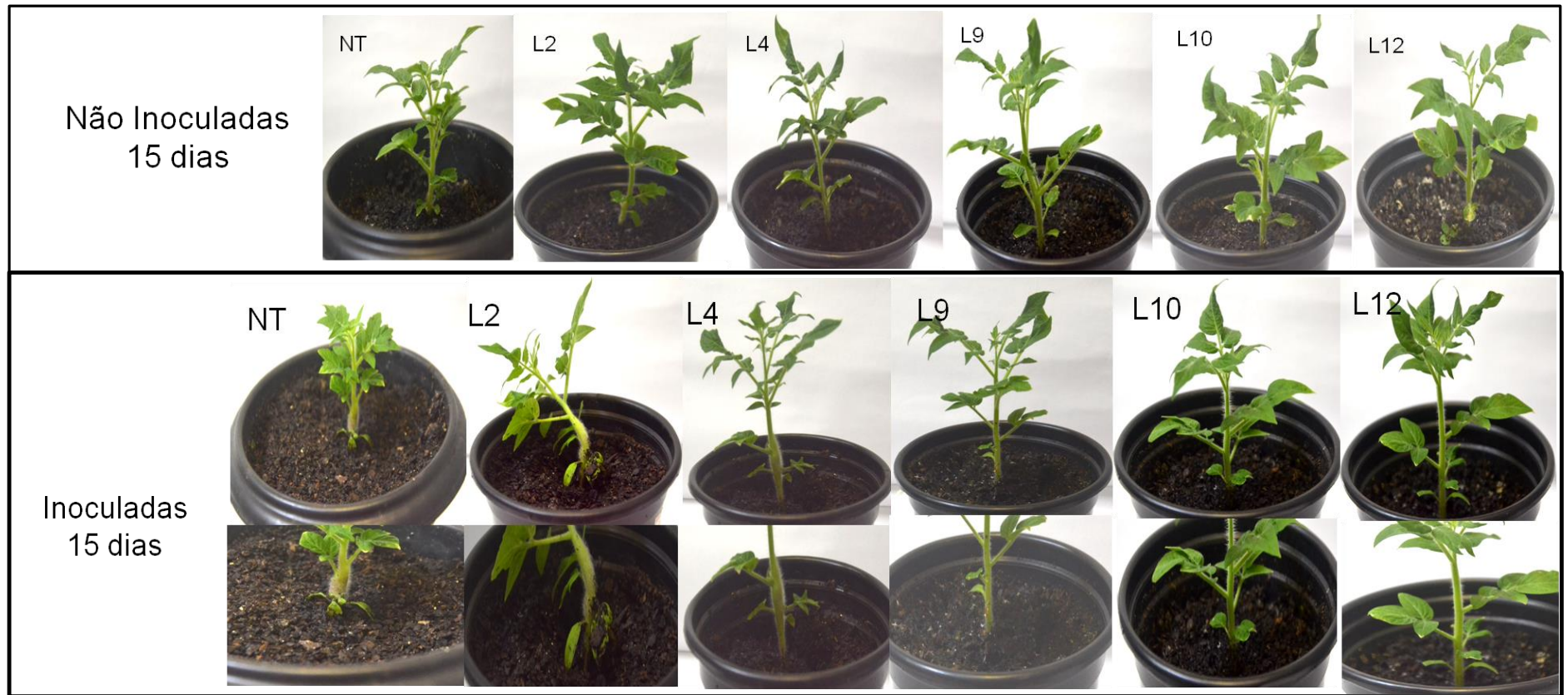


Figura 9. Avaliação 15 dias- *S.lycopersicum* sem inoculação e inoculadas com *M. pernicioso*. Visualização dos sintomas (inchaço caulinar e superbrotamento). Planta não transformada (NT), linhagens superexpressando BiP (L2 a L12).

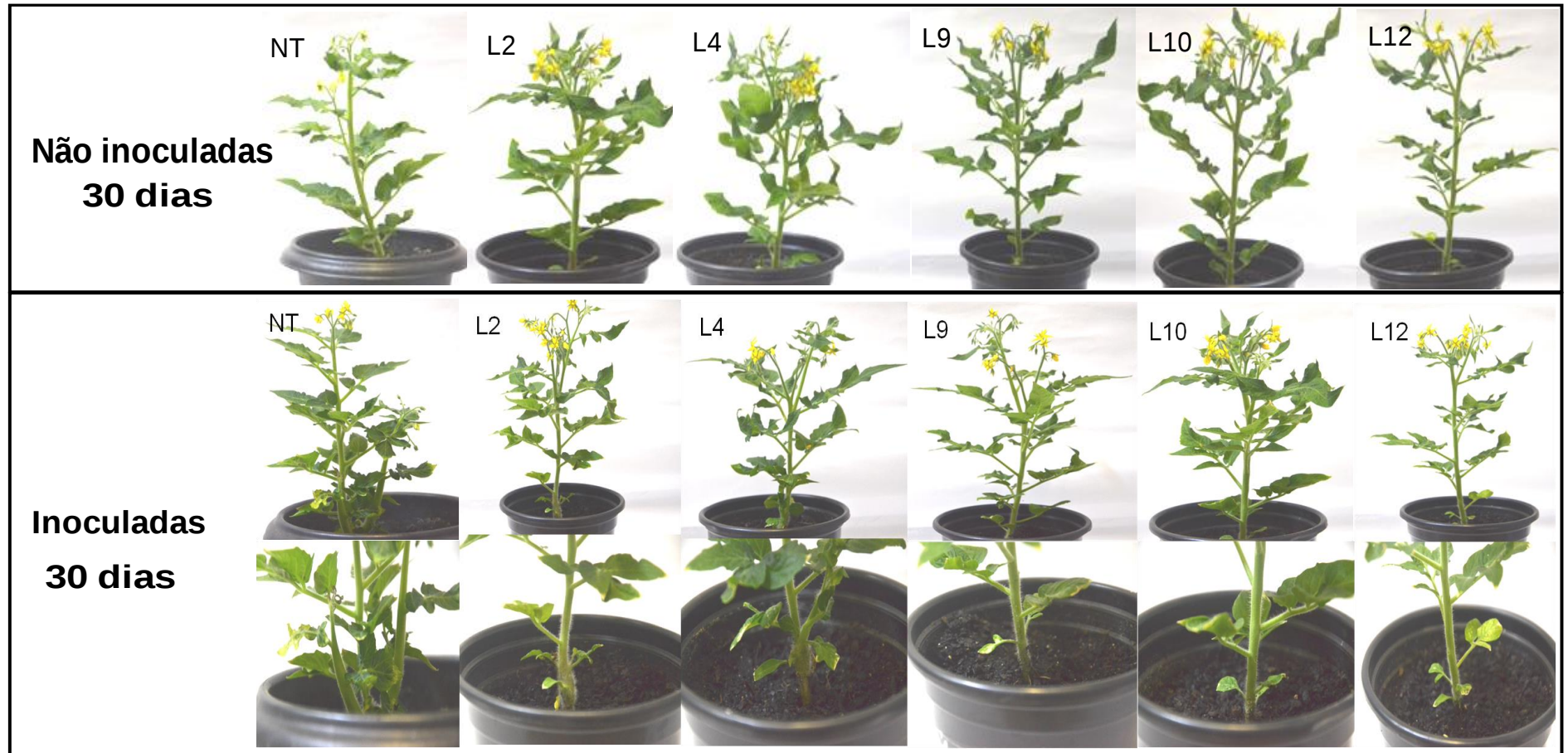


Figura 10. Avaliação 30 dias- *S.lycopersicum* sem inoculação e inoculadas com *M. perniciosa*. Visualização dos sintomas (inchaço caulinar e superbrotamento). Planta não transformada (NT), linhagens superexpressando BiP (L2 a L12).



Figura 11. Avaliação 45 dias- *S.lycopersicum* sem inoculação e inoculadas com *M. perniciosa*. Visualização dos sintomas (inchaço caulinar e superbrotamento). Planta não transformada (NT), linhagens superexpressando BiP (L2 a L12).

A análise das plantas inoculadas com o *M. pernicioso* revelou que as plantas transgênicas inicialmente se desenvolveram mais rápido. Mas que a partir do 20º dia de cultivo as alturas não apresentavam mais diferença significativa (Figura 12). De maneira geral observamos que, na ausência da inoculação, as plantas transformadas (L2 a L12) cresceram mais rapidamente do que as não transformadas durante os 20 primeiros dias de cultivo. A partir dos 30 dias de cultivo, no entanto, a taxa de crescimento das plantas transgênicas parece diminuir não sendo observada diferença significativa na altura final das plantas, ao florescer. Exceto a L12 que apresentou altura final maior do que todas as demais plantas (Figura 13).

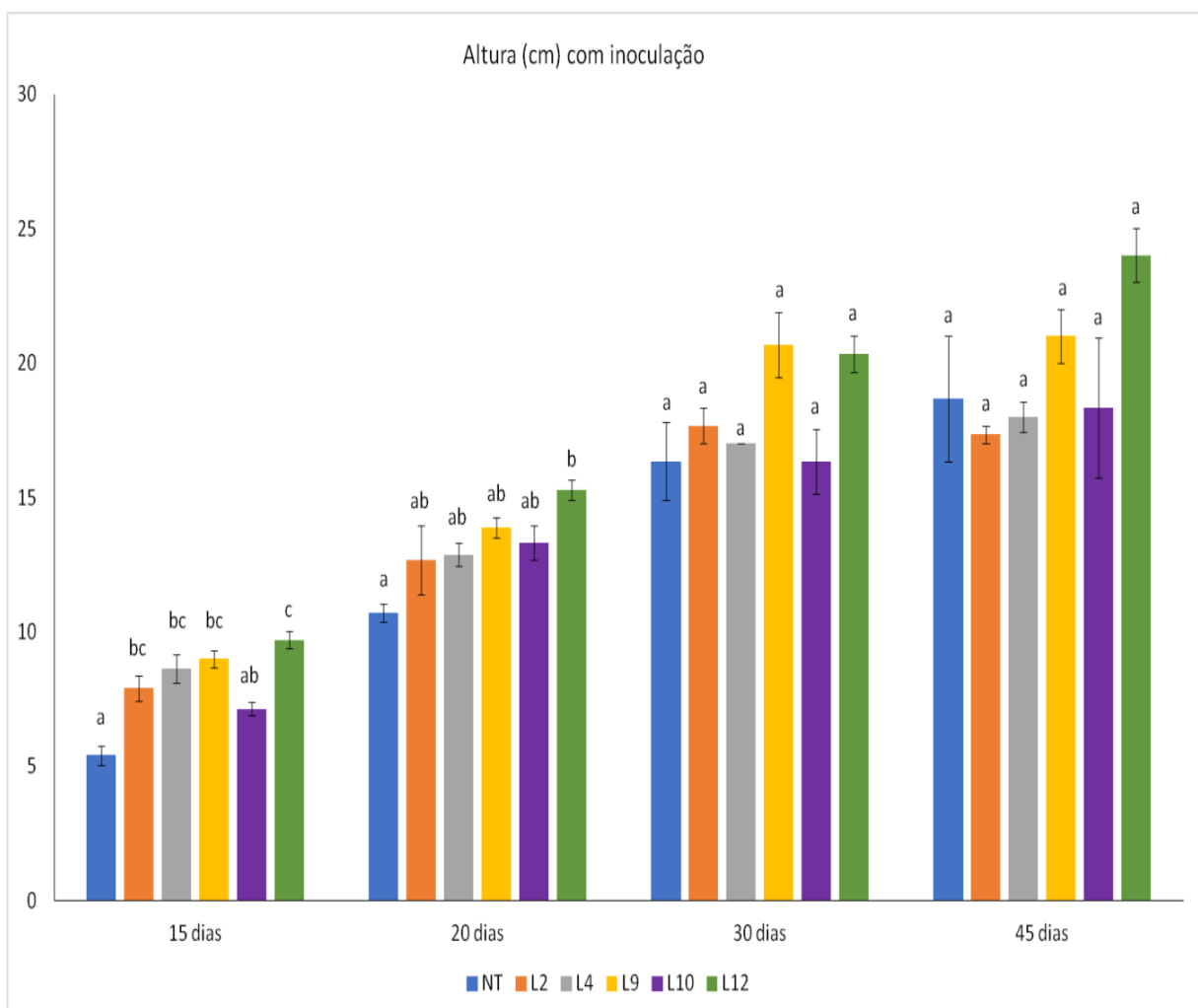


Figura 12. Altura das plantas nos tempos 15, 20, 30 e 45 dias após a inoculação com *M. pernicioso*. Planta não transformada (NT), linhagens superexpressando BiP (L2 a L12). Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As barras correspondem aos erros padrões das médias.

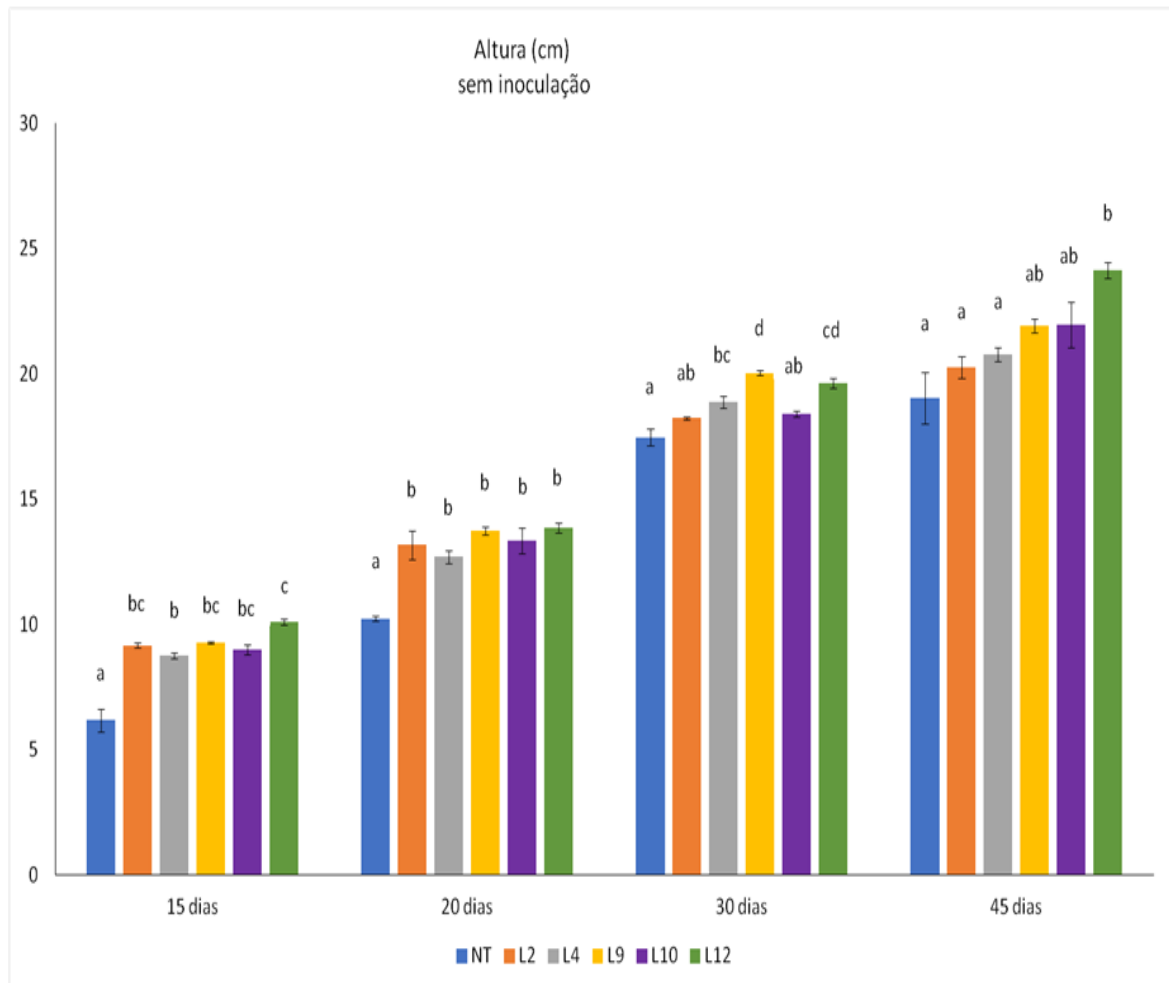


Figura 13. Altura das plantas sem inoculação nos tempos 15, 20, 30 e 45 dias. Planta não transformada (NT), linhagens superexpressando BiP (L2 a L12). Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As barras correspondem aos erros padrões das médias.

Todas as plantas analisadas começaram a florescer após 20 dias de cultivo na casa de vegetação. Sendo o número de flores nas plantas transgênicas superior. A floração das plantas, inoculadas ou sem inoculação, iniciou-se a partir do 20º dia de cultivo. De maneira geral, e em ambas as situações, as plantas transgênicas produziram mais flores do que as NT, sendo a linhagem L12 a que mais floresceu. Foi observado também que sob inoculação o número de flores produzidas pelas plantas diminuiu. Interessantemente mesmo as plantas transgênicas que não apresentaram sintomas da doença, como a L9 e L12 tiveram a produção de flores aumentada. Contudo, observa-se que enquanto nas plantas NT chega a 80% as transgênicas ficam na ordem dos 50% (Figura 14 A e B).

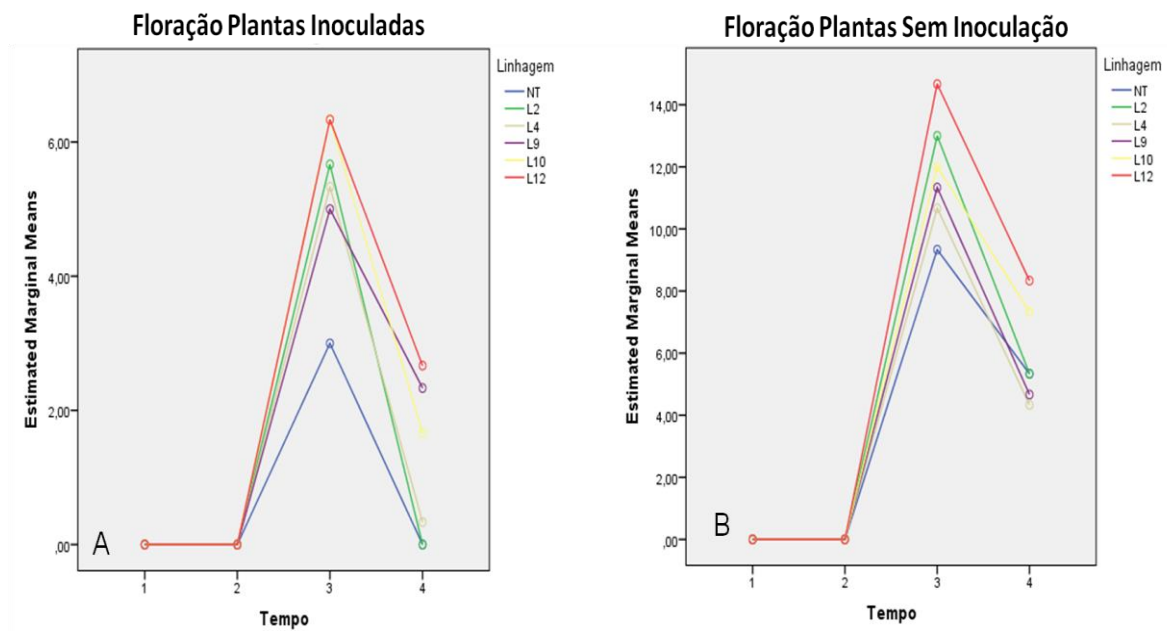


Figura 14. Floração nos tempos 15, 20, 30 e 45 dias, plantas inoculadas e sem inoculação. (A) plantas inoculadas com *M. perniciosa*. (B) Plantas não inoculadas: Teste Friedman. Planta não transformada (NT), linhagens superexpressando BiP (L2 a L12).

Os frutos foram observados a partir do 30º de cultivo das plantas. Todas as plantas que não foram submetidas à inoculação por *M. perniciosa* apresentaram frutos sendo a maior quantidade na L12 e a menor quantidade na planta não transformada (Figura 15B). Contudo, as plantas não transformadas inoculadas não formou frutos até o final do experimento (Figura 15A). Nessas as flores caducaram. Em contrapartida, todas as plantas transgênicas formaram frutos após a inoculação, mesmo aquelas que apresentaram hiperplasia e hipertrofia (Figura 15A). Isso indica que, em plantas transformadas, a superexpressão de BiP pode estar atuando na diminuição do estresse causado pela infecção, induzindo a expressão de genes relacionados a tolerância e regulação direta da homeostase celular.

Sob estresse, as plantas transgênicas inoculadas pelo fungo *M. perniciosa*, apresentaram uma melhor resposta quanto ao número de flores e frutos em relação às plantas controles. Mesmo mostrando sintomas da doença, as linhagens L2 e L4 apresentaram maior quantidade de flor e frutos em relação às plantas NTs.

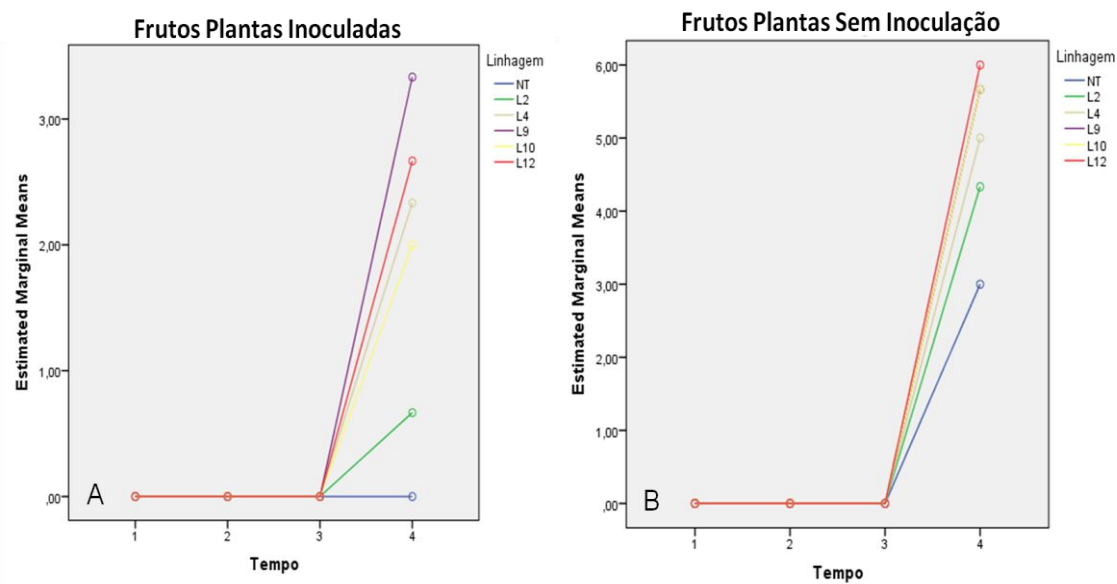


Figura 15. Número de frutos nos tempos 15, 20, 30 e 45 dias, plantas inoculadas e sem inoculação. (A) plantas inoculadas com *M. perniciosa*. (B) Plantas não inoculadas: Teste Friedman. Planta não transformada (NT), linhagens superexpressando BiP (L2 a L12).

Em conjunto, nossos dados sugerem que há uma relação entre o nível de BiP nas plantas e a tolerância ao *M. perniciosa* visto que as plantas transgênicas que não apresentaram sintomas são as mesmas linhagens com maior acúmulo de BiP. As plantas transgênicas com acúmulo intermediário de BiP apresentaram sintomas iniciais mas esses foram menos intensos do que os observados nas plantas não transformadas. Cabe ressaltar que o presente trabalho é o primeiro a avaliar a possível ação de BiP na tolerância de plantas ao ataque de um fungo hemibiotrófico. A interação com o *M. perniciosa* é complexa e induz nas plantas infectadas a formação de cristais de oxalato de cálcio, acúmulo de espécies reativas de oxigênio, PCD (morte celular programada) bem como necrose (CEITA et al.; 2007; PUNGARTNIK et al., 2009; DIAS et al., 2011; BASSO et al., 2016). Esses mecanismos, no decorrer da interação, aumenta a disponibilidade de nutrientes a serem utilizados para a nutrição dos micélios fúngicos contribuindo para o desenvolvimento vigoroso do mesmo permitindo que o ciclo da doença ocorra (CEITA et al.; 2007). Estudos com BiP já relatam o envolvimento da proteína na atenuação e controle de PCD, em células vegetais, principalmente desencadeada por estresse hídrico esses trabalhos sugerem a ação de BiP via modulação osmótica, na regulação de PCD desencadeada por resposta imune e por estresse no retículo endoplasmático (WANG et al., 2007; REIS et al., 2011; XU et al., 2012; CARVALHO et al., 2013).

Todas as situações de estresse em organismos eucariotos gera o aumento na produção de proteínas pertencentes à rota secretora. Sabe-se que todas as proteínas residentes de retículo, mantidas no complexo de golgi, em membrana ou parede celular e as secretadas pelas células perpassam por esta rota. Por isso, independente do tipo de estresse, mudanças na composição de parede ou membrana celular, bem como produção de proteínas de defesa (PRs) ou ataque (como proteases, lipases, quitinases) a serem secretadas fazem parte da primeira esfera de defesa do organismo. Por outro lado, a rota secretora para funcionar necessita de proteínas que irão atuar no dobramento das proteínas da rota secretora, como BiP (DENG et al., 2013; FANATA et al., 2013). Toda vez que há o acúmulo de proteínas mal dobradas no RE, ocorre à indução da via de resposta a proteínas mal dobradas (unfolded protein response - UPR), que aumenta a expressão de *BiP* e outras proteínas residentes do RE. O acúmulo de proteínas mal dobradas ocorre quando a rota secretora esta sob maior demanda e a essa situação denominamos de estresse de RE. Para atenuar o estresse de RE a célula precisa sintetizar mais BiP via ativação da UPR. Estudos anteriores sugerem que um nível maior de BiP no RE, como nas plantas transgênicas aqui obtidas, pode atuar como um tampão para o estresse de RE. Ou seja, plantas com maior nível dessa proteína estariam mais aptas a produzir imediatamente as proteínas da rota secretora ou produzi-las com maior eficiência dando ao organismo uma vantagem molecular na defesa contra estresse (FU et al., 2016; WAN & JIANG, 2016; BAO & HOWELL, 2017; SRIVASTAVA et al., 2018; KOPP et al., 2019).

O não aparecimento de sintomas característicos de vassoura-de-bruxa nas linhagens L9, L10 e L12 pode estar relacionado a níveis maiores de acúmulo da proteína BiP, observado no teste de *immunoblotting* (Figura 7), sugerindo uma resposta mais eficaz das plantas em resposta as vias PCD e/ou UPR, induzidas pelo patógeno.

Visando testar se a superexpressão de BiP induz ou protege as plantas ao estresse oxidativo, submetemos as plantas transgênicas e controle ao ensaio histoquímico com DAB-HCl. Nesse, a coloração marrom dos tecidos relaciona-se com a quantidade de peróxido de hidrogênio presente no mesmo. Ao submeter as plantas de tomate transgênicas e controle ao teste, observamos que as linhagens transgênicas possuem menos peróxido de hidrogênio do que as plantas controle (NT) (Figura 16). Observamos que discos foliares isolados de plantas NT e

transgênicas, quando infiltrados com água, apresentam coloração final translúcida, como esperado visto que nesse caso não se utilizou o DAB-HCL (Figura 16, letras A e B). Contudo, ao se infiltrar a vácuo DAB-HCL nesses tecidos foliares observa-se a presença de maior quantidade de peróxido de hidrogênio nas plantas NT (vide coloração escura na Figura 16, letra C) em comparação com todas as linhagens Transgênicas (comparar C com D- G na Figura 16). H₂O

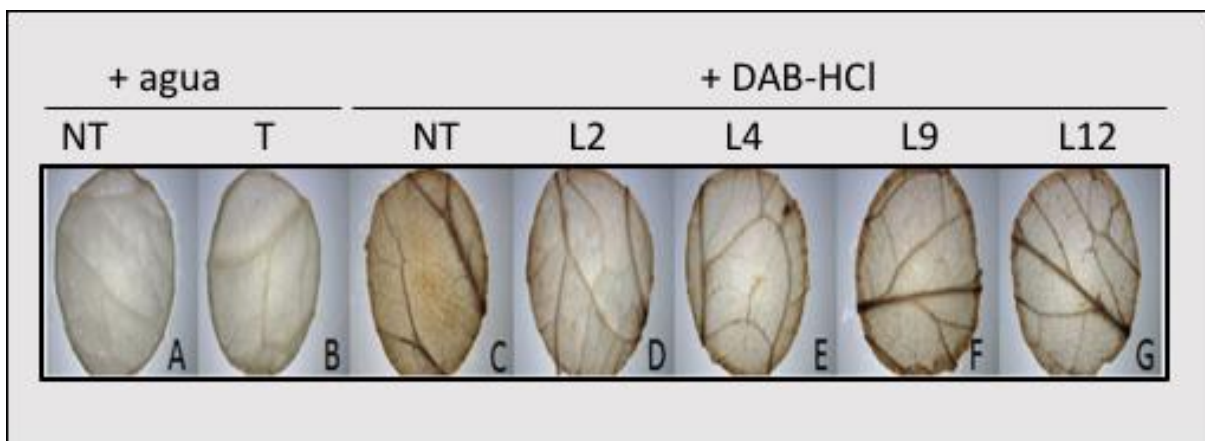


Figura 16. Detecção de peróxido de hidrogênio em tecido foliar de *S. lycopersicum* não inoculado com *M. perniciosa*. Discos foliares foram isolados das plantas não transformadas e transgênicas e submetidos a análise com HCL-DAB (1 mg/ mL⁻¹). Os discos foliares NT (A) e transgênica (B) foram infiltrados com água. Em C, planta NT, e em D e G, plantas transformadas infiltradas com HCL-DAB. Discos isolados da terceira folha expandida das plantas. Fotos ilustrativas de 6 amostras de discos foliares analisadas.

Em seguida testamos a quantidade de peróxido de hidrogênio existente nas plantas infectadas com *M. perniciosa*. Isso porque sabidamente estresses bióticos e/ou abióticos ocasionam o acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) que por sua vez está diretamente relacionado com a amplificação do estresse de retículo endoplasmático que alteram o metabolismo celular desencadeando o aumento de proteínas mal dobradas que em grandes quantidades causam danos a célula vegetal (ZHANG et al., 2007; MALHOTRA & KAUFMAN, 2007). O material utilizado foram as plantas após 15 dias de inoculação. Observamos um resultado muito similar ao observado para as plantas não infectadas. Ou seja, as plantas NT possuem maior quantidade de peróxido de hidrogênio do que as linhagens transgênicas (Figura 17). As linhagens transgênicas L2 e L4 que no momento da coleta já apresentavam o entumescimento do caule, demonstraram ter um nível de peróxido de hidrogênio baixo e próximo ao observado para as plantas transgênicas assintomáticas, L9 e

L12. Esse dado sugere que ainda que as plantas transgênicas apresentem sintomas de vassoura de bruxa o nível de estresse oxidativo das mesmas parece ser acentuado devido ao maior acúmulo de BiP. De fato, plantas de Tabaco (*Nicotiana tabacum*) superexpressando BiP e submetidas a estresse por cádmio, apresentaram menor acúmulo de ROS em comparação ao controle (GUAN et al., 2015). Em um experimento reverso, ao silenciar um gene *BiP* (*CaBiP1*) em pimenta, foi observado maior acúmulo de H_2O_2 nas plantas e consequente perda de tolerância a estresses abióticos como estresse hídrico e osmótico (WANG, et al., 2017). Assim, de acordo com a literatura, BiP atua restaurando o equilíbrio no retículo endoplasmático (CARVALHO et al., 2014; ZEESHAN et al., 2016). No nosso experimento, o menor acúmulo de H_2O_2 nas linhagens transgênicas submetidas ou não ao estresse indicam a atividade de BiP na proteção celular, restauração da homeostase celular e regulação do RE.

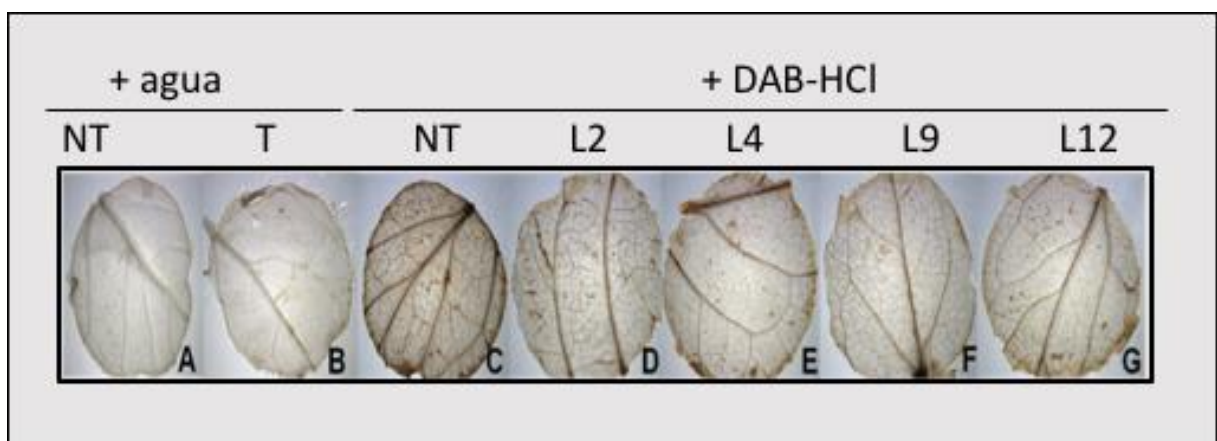


Figura 17. Detecção de peróxido de hidrogênio em tecido foliar de *S. lycopersicum* inoculado com *M. perniciosa*. Discos foliares foram isolados das plantas não transformadas e transgênicas, após 15 dias de inoculação com *M. perniciosa*, e submetidos a análise com HCL-DAB (1 mg/ mL -1). Os discos foliares NT (A) e transgênica (B) foram infiltrados com água. Em C, planta NT, e em D e G, plantas transformadas infiltradas com HCL-DAB. Discos isolados da terceira folha expandida das plantas. Fotos ilustrativas de 6 amostras de discos foliares analisadas.

6.4 AVALIAÇÃO DE FRUTOS E SEMENTES DE PLANTAS CONTROLES E TRANSFORMADAS SOB ATAQUE DA MOSCA BRANCA (*Bemisia tabaci*)

A análise estatística quanto ao número de frutos e sementes coletados das plantas controles e linhagens transgênicas (L2, L4, L9, L10 e L12) presentes na casa de vegetação sob o ataque da mosca branca mostrou diferenças significativas entre

os tratamentos. O resultado da análise do número de frutos (Figura 18) entre a planta controle e as linhagens L2, L4, L9 e L12 apresentaram um maior número de frutos quando comparadas a planta controle ao longo das coletas. No entanto a Linhagem L10 não apresentou diferença estatística significativa quanto ao número de frutos com a planta NT ($p < 0.05$). Em relação ao número de sementes (Figura 19) foi mostrado que as linhagens transgênicas apresentaram maior quantidade comparado com as NTs, mesmo em estresse por ataque de *Bemisia tabaci* conhecida por mosca branca. Ainda que a L10 e a planta NT não tenham diferido significativamente em número de frutos, quando comparadas em número de sementes os resultados apontaram uma maior quantidade da linhagem L10 sobre a NT. O tamanho dos frutos coletados também foi observado, onde as linhagens transgênicas apresentaram maiores frutos em relação às plantas não transformadas (Figura 20).

Uma análise dos níveis de BiP em soja (*Glycine max* L. Merr.) sob ataque de mosca branca indicou a superexpressão dos níveis de mRNA de BiP em folhas e aumento no acúmulo da proteína, levando a planta a aclimação e recuperação de ferimentos causados pelo inseto (KALINSKI et al., 1995). Isso pode indicar que a maior expressão e atividade de BiP na dobragem e translocação de proteínas, regulação de processos no RE, e proteção celular em condições de estresse, estejam envolvidos na resposta fisiológica de plantas que se encontram sob ataque de patógenos. Essas informações corroboram com os resultados obtidos após a inoculação das plantas transgênicas com *M. perniciosus*, em que as linhagens superexpressando BiP obtiveram frutos e as controle não. As plantas submetidas a campo sofrem a ação de diversos estresse bióticos e abióticos simultaneamente. Os nossos dados mostram que além de melhorar a tolerância da planta a mais de um tipo de estresse biótico, as plantas melhoraram sua produtividade, por reduzir os danos causados pela praga.

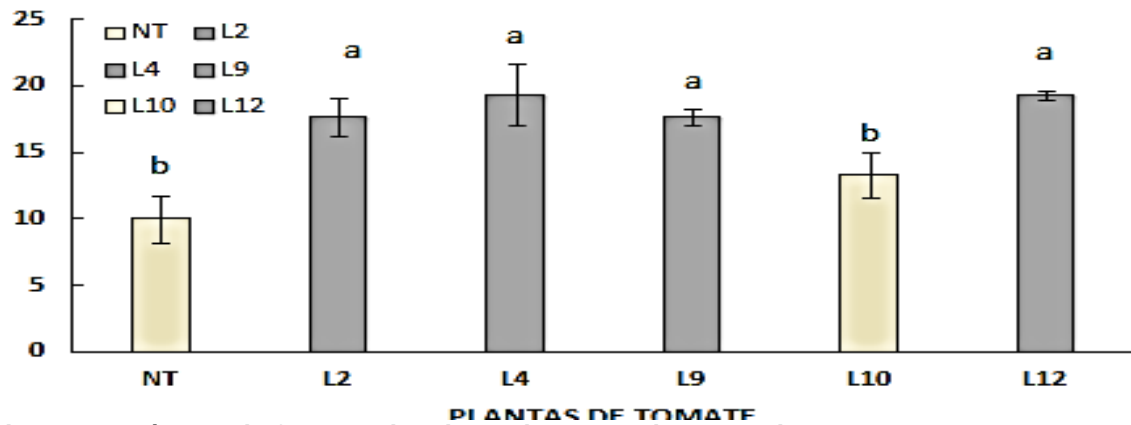


Figura 18. Número de frutos coletados sob ataque da mosca branca NT, L2, L4, L9, L10 e L12. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As barras correspondem aos erros padrões das médias.

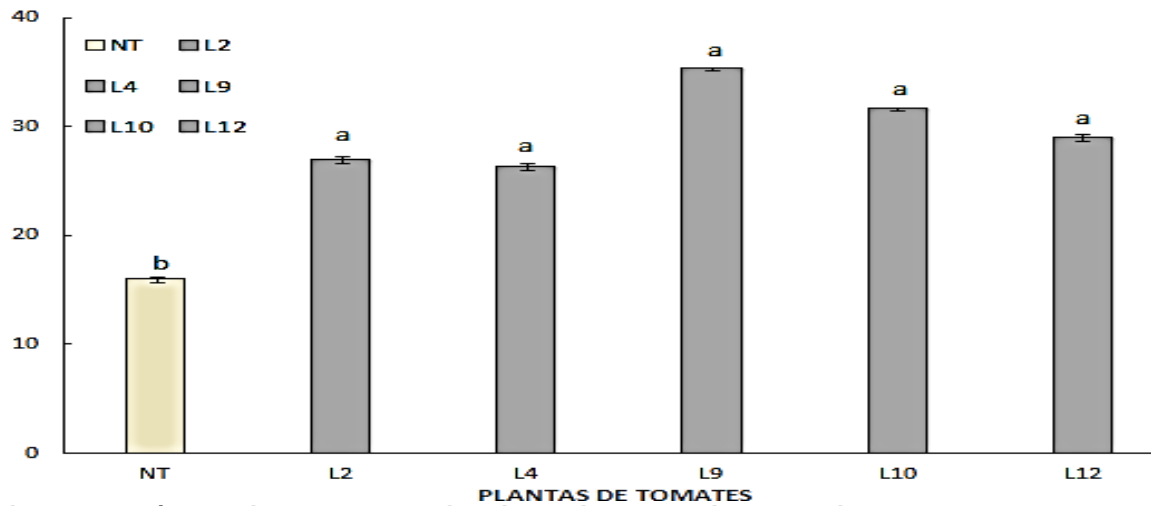


Figura 19. Número de sementes coletados sob ataque da mosca branca NT, L2, L4, L9, L10 e L12. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As barras correspondem aos erros padrões das médias.

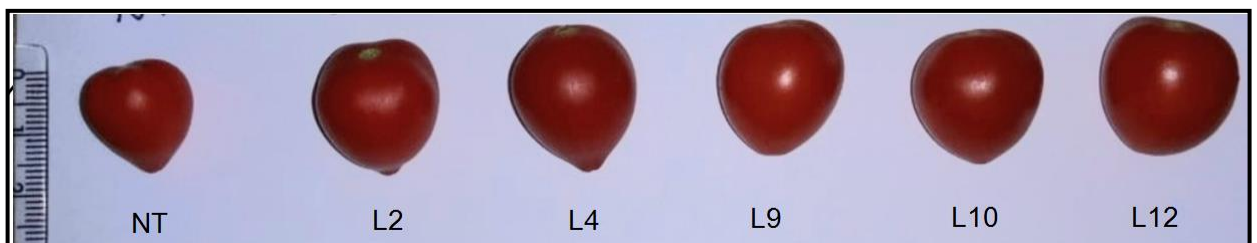


Figura 20. Frutos de linhagens transformadas e não transformadas. (L2 a L12) frutos de linhagens transgênicas e (NT) fruto linhagem não transformada.

6.5 OBTENÇÃO E COMPARAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE PLANTAS TRANSFORMADAS E NÃO TRANSFORMADAS

Com base na análise de imudeteccção que revelou maior acúmulo de BiP na linhagem 12, resolvemos então, obter o perfil proteico dessa planta comparando-a com a planta controle, afim de verificar diferenças nos perfis de expressão nessas plantas. A avaliação do perfil proteico das linhagens permite a caracterização de proteínas que possam estar envolvidas em respostas e regulação de estresses nas plantas. Estudos comparativos e quantitativos do perfil de proteínas durante respostas a estresses permitem análise e caracterização de processos regulatórios para entendimento da fisiologia da planta para sua defesa e interação com outras proteínas para adaptação ao ambiente (TIMPERIO et al., 2008). Os perfis proteicos da planta controle (NT) e transgênica (L12) resolvidos em gel 2D-SDS-PAGE, mostraram diferenças numéricas dos spots. Em géis da planta NT foram detectados 84 spots, enquanto que nos géis da planta L12 foram detectados 137(Figura 21).

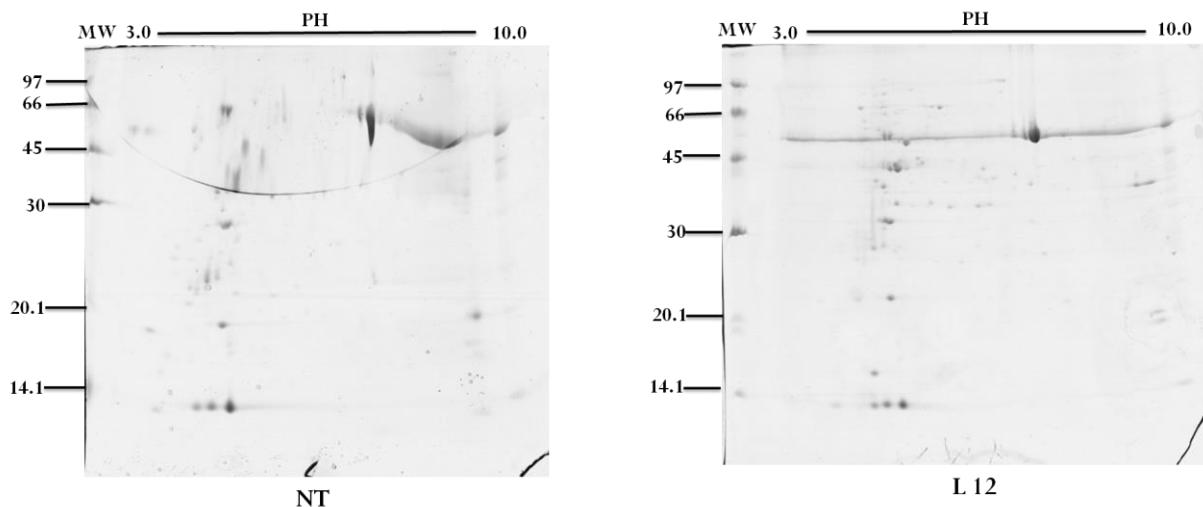


Figura 21. Perfil proteico bidimensional de folhas de *Solanum lycopersicum*. (NT) Plantas não transformadas e **(L12)** superexpressando o gene BiP.

A identificação de proteínas acumuladas diferencialmente entre a planta NT e L12 resultou na identificação de um total de 78 spots exclusivos para NT e 111 spots em L12, sendo 6 spots comuns entre eles (Figura 22).



Figura 22. Diagrama de Venn da distribuição de proteínas exclusivas e comuns. Proteínas detectadas pelo *Image Master 2D Platinum* (GE Healthcare). Foi considerado ANOVA ($p \leq 0,05$) para a distribuição de proteínas diferenciais significativas. **L12:** Linhagem transformada; **NT:** Planta não transformada.

Os spots foram detectados em todas as faixas de pH (3-10). Em NT a distribuição das proteínas em relação ao pI, revelou uma maior concentração do número de spots em uma faixa de pH entre 4 e 5, e para L12, numa faixa de pH de 4 a 5 e 5 a 6 com 45 e 40 spots, respectivamente. As amostras apresentaram menor quantidade de proteínas nos pHs 8 e 9 (Figura 23).

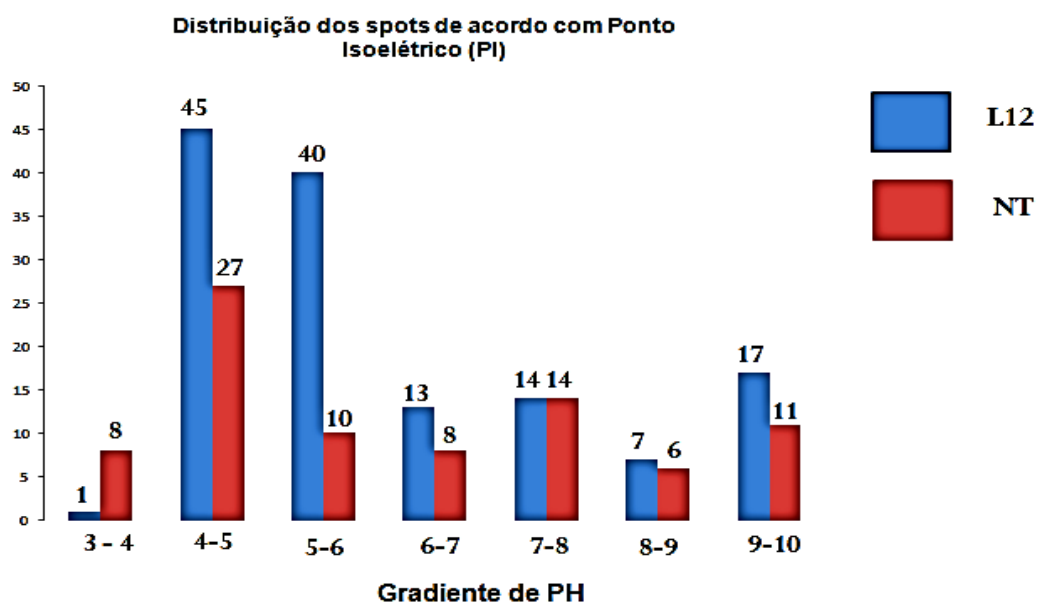


Figura 23. Distribuição dos spots detectados em 2D-SDS-PAGE de folhas de *Solanum lycopersicum* quanto ao ponto isoelétrico (pI). L12: Linhagem transformada; NT: Planta não transformada.

Os resultados da análise de peso molecular mostram predominância na distribuição dos spots para a amostra NT, em uma faixa de < 30 kDa, com 47 spots e de 30 a 66 kDa, com 32 spots. Para a linhagem transgênica L12, o número de spots foi maior na faixa entre 30 a 66 kDa, com 83 spots. Em todas as amostras foram observadas menores quantidades de spots com peso molecular > 66 kDa, com 5 spots para NT e 21 para L12 (Figura 24).

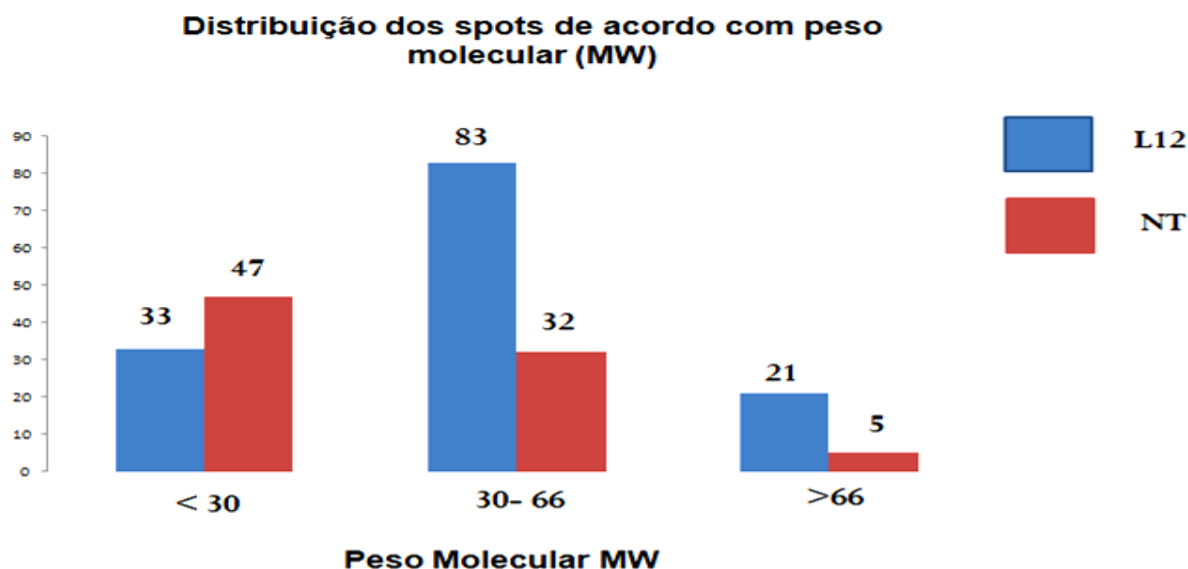


Figura 24. Distribuição dos spots detectados em 2D-SDS-PAGE de folhas de *Solanum lycopersicum* de acordo com a massa molecular (kDa). L12: Linhagem transformada; NT: Planta não transformada.

A comparação entre os géis, apresentou diferenças quanto ao número de spots entre as amostras, na distribuição de proteínas em relação ao ponto isoelétrico (pI), peso molecular (PM) e na quantidade de spots proteicos exclusivos entre Linhagem L12 e NT. Os matches entre os géis, revelaram diferenças no acúmulo de proteínas, com isso, a partir da identificação dos spots diferenciais e comuns pretende-se reconhecer quais são as proteínas presentes em plantas superexpressando soyBiP e como essas podem atuar na resposta a estresses bióticos e abióticos.

7. CONCLUSÃO

Foram identificadas duas proteínas do gene BiP para cacau e quatro para tomate. As análises mostraram que os genes BiP são altamente conservados quanto a sua estrutura gênica e proteica, apresentado dois domínios proteicos (NBD e SBD)

característicos da família. Nas plantas transgênicas inoculadas com *M. perniciososa*, obtivemos um maior acúmulo da proteína, o que foi eficiente na contenção dos sintomas da doença, agindo na atenuação do estresse causado pelo patógeno e na morte celular das plantas. Além disso, a superexpressão do gene parece estar relacionado com a diminuição na produção de H_2O_2 e na resposta fisiológica da planta por operar na homeostase celular, tanto nas plantas inoculadas com o fungo MP quanto nas sem inoculação e nas submetidas ao ataque de mosca branca. A caracterização do perfil proteico indicou uma maior quantidade de proteínas nas linhagens transgênicas quando em comparação com as plantas controle. Esses dados poderão auxiliar estudos posteriores para o melhoramento de plantas quando em situação de infecção biótica por ataques de patógenos.

8. REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL. Anuário da agricultura brasileira. São Paulo. 2004 (Consultoria & Comércio).
- ARGOUT, Xavier et al. The genome of *Theobroma cacao*. **Nature genetics**, v. 43, n. 2, p. 101, 2011.
- ALMEIDA, D. S. M. **Estudos funcionais de fatores de transcrição envolvidos na interação *Theobroma cacao*- *Moniliophthora perniciosa***. 2016. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, BA.
- ALMEIDA, O. C., CHIACCHIO, F. P. B.; ROCHA, H. M. Sobrevivência de *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer em vassouras secas de cacaueiros (*Theobromacacao* L.) do estado da Bahia. **Agrotrópica**. 9, 23–28, 1997.
- ALVIM, F.C.; CAROLINO, S.M.B.; CASCARDO, J.C.M.; NUNES, C.C.; MARTINEZ, C.A.; OTONI, W.C.; FONTES, E.P.B. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. **Plant Physiol**. 126:1042-1054, 2001.
- BAO, Y; HOWELL, S. H. The unfolded protein response supports plant development and defense as well as responses to abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**. 8, 344, 2017.
- BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology**. v. 34, n. 2, p. 306–312, 1985.
- BEG, M. S.; AHMAD, S.; JAN, K.; BASHIR, K. Status, supply chain and processing of cocoa - A review. **Trends in Food Science & Technology**. 66, 108-116, 2017.
- BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review Plant Biology**. 60, 379–406, 2009.
- BOSTON, R.S.; VIITANEN, P.V.; VIERLING, E. Molecular chaperones and protein folding in the plants. **Plant Mol. Biol**. 34:191-222, 1996.
- BUKAU, B., HORWICH, A.L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell**, v. 92 p.351-366, 1998.
- CAGLIARI, T.C.; TIROLI, A.O.; BORGES, J.C.; RAMOS, C.H.I. Identification and in

silico expression pattern analysis of Eucalyptus expressed sequencing tags (ESTs) encoding molecular chaperones. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p. 520-528, 2005.

CARVALHO, H. H.; SILVA, P. A.; MENDES, G. C.; BRUSTOLINI, O. J. B.; PIMENTA, M. R.; GOUVEIA, B. C.; VALENTE, M. A. S.; RAMOS, H. J. O.; SOARES-RAMOS, J. R. L.; FONTES, E. P. B. The endoplasmic reticulum binding protein BIP displays dual function in modulating cell death events. **Plant Physiol.** 164:654–670. 14, 2014.

CARVALHO, H. H.; SILVA, P. A.; MENDES, G. C.; BRUSTOLINI, O. J. B.; PIMENTA, M. R.; GOUVEIA, B. C.; FONTES, E. P. B. The Endoplasmic Reticulum Binding Protein BiP Displays Dual Function in Modulating Cell Death Events. **Plant Physiology**, 164(2), 654–670, 2013.

CASCARDO, J.C.M.; ALMEIDA, R.S.; BUZELI, R.A.A.; CAROLINO, S.M.B.; OTONI, W.C.; FONTES, E.P.B. The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. **J. Biol. Chem.** 275, p.14494-14500, 2000.

CEITA, G.O.C.; MACÊDO, J.N.A.; SANTOS, T.B et al. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in Theobroma cacao tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Science**. 173, 106117, 2007.

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

CHISHOLM, ST, COAKER, G., DAY, B. & STASKAWICZ, BJ Host-microbio interações: moldando a evolução da resposta imune da planta. **Cell**. 124 , 803-814 2006.

DE ARRUDA, M. C. C. et al. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis perniciosa* from different geographic origins and hosts. **Mycological research**. v. 107, n. Pt 1, p. 25–37, 2003.

DENECKE, J. Soluble endoplasmatic reticulum resident proteins and their function in protein syntesis and transpot. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 34, p.197-205, 1996.

DENECKE, J.; GOLDMAN, M.H.; DEMOLDER, J.; SEURINCK, J.; BOTTERMAN, J. The tobacco luminal binding protein is encoded by a multigene family. **Plant Cell**. v. 3, p. 1025-1035, 1991.

DENG, Y; SRIVASTAVA, R; HOWELL, S. H. Endoplasmic reticulum (ER) stress response and its physiological roles in plants. **Int. J. Mol. Sci.** 14, 8188–8212, 2013.

DIAS, C.V.; MENDES, J.S.; DOS SANTOS, A.C.; PIROVANI, C.P.; DA SILVA GESTEIRA, A.; MICHELI, F.; GRAMACHO, K.P.; HAMMERSTONE, J.; MAZZAFERA, P.; DE MATTOS CASCARDO, J.C. Hydrogen peroxide formation in cacao tissues infected by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Physiol. Biochem.** 49, 917–922, **2011**.

DIAS, L. A. S. "Origem e dispersão de *Theobroma cacao* L.: um novo cenário." Melhoramento genético do cacaueiro. **Viçosa: Funape**. p.81-127, 2001.

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

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. 12,13–15, 1990.

DILLINGER, T. L., BARRIGA, P., ESCARCEGA, S., JIMENEZ, M., LOWE, D. S., & GRIVETTI, L. E. Food of the Gods: Cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. **Journal of Nutrition**, 130, 2057–2072, 2000.

ENGLISH, C. A.; SHERMAN, W.; MENG, W.; GIERASCH, L. M. The Hsp70 interdomain linker is a dynamic switch that enables allosteric communication between two structured domains. **J. Biol. Chem.** 292, 14765–14774, 2017.

EVANS, H. C. Witches' Broom Disease (*Moniliophthora perniciosa*): History and Biology. In: **Cacao Diseases**. Springer, Cham, p. 137-177, 2016.

EVANS, H. C.; BEZERRA, J. L.; BARRETO, R. W. Of mushrooms and chocolate trees: aetiology and phylogeny of witches' broom and frosty pod diseases of cacao. **Plant Pathology**, v. 62, n. 4, p. 728–740, 2013.

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

EVANS, H. C. et al. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. **Canadian Journal of Botany**, v. 56, n. 20, p. 2528– 2532, 1978.

FANATA, D. W. I; LEE, S. Y; LEE, K. O. The unfolded protein response in plants: a fundamental adaptive cellular response to internal and external stresses. **J. Proteomics** 93, 356–368, 2013.

FAO; FAOSTAT. Food and agriculture. Production quantities of cocoa, beans by country. **Average** 1994-2014, 2017.

FERREIRA, R. M. **Componentes epidemiológicos e perfil de proteínas secretadas de isolados de *Moniliophthora perniciosa* de cacaueiro e hospedeiros solanáceos.** Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia molecular)- Universidade Estadual de Santa Cruz. Bahia. 2016.

FIETTO, L.G.; et al. Identification and in silico analysis of the Citrus HSP70 molecular chaperone gene family. **Genet. Mol. Biol.**, V.30, p. 881-887, 2007.

FORWARD, B. S.; MISRA, S. Characterization and expression of the Douglas-fir luminal binding protein (PmBip). **Planta**, v. 70, 2000.

FRIAS, G.A., PURDY, L.H. E SCHMIDT, R.A. An inoculation method for evaluating resistance of cacao to *Crinipellis perniciosa*. **Plant Disease**. 79, 787, 1995.

FU, C; LIU, X. X; YANG, W. W; ZHAO, C. M; LIU, J. Enhanced salt tolerance in tomato plants constitutively expressing heat-shock protein in the endoplasmic reticulum. **Genetics and Molecular Research**. 15, 2016.

GALILI, G, SENGUPTA-GOPALAM, C, CERIOTTI, A. The endoplasmic reticulum of plant cells and its role in protein maturation and biogenesis of oil bodies. **Plant Mol. Biol.** 38:1-29, 1998.

GESTEIRA, A.S., MICHELI, F., CARELS, N. et al. Comparative Analysis of Expressed Genes from Cacao Meristems Infected by *Moniliophthora perniciosa*. **Ann Bot-London**. v 100, 129-140, 2007.

GHETHING, M.J. Role and of the ER chaperone BiP. **Sem.Cell Dev. Biol**, v. 10 p. 465-479, 1999.

GHETHING, M.J.; SAMBROOK, J. Protein folding in the cell. **Nature**, v. 355 p.33-45, 1992.

GRAMACHO, K. P.; PIRES, J. L.; LOPES, U. V.; BEZERRA, J. L. Vassoura-de-Bruxa, evolução do fungo e necessidade de remoção das partes afetadas em clones resistentes. 28 Semana do fazendeiro - **Agenda Técnica**. Uruçuca. v. 28. p.423-426, 2006.

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

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis perniciosa*. **Heredity**. v. 72, n. 3, p. 278–289, 1994a.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. Spatial distribution of mycelia of the liana (L-) biotype of the agaric *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer in tropical forest. **New**

Phytologist. v. 127, n. 1, p. 243–259, 1994b.

HAMMOND C, HELENIUS A. Quality control in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:523-529, 1995.

HEBBAR, P. K. Cacao diseases: A global perspective from an industry point of view. *Phyto pathology*, 97, 1658-1663, 2007.

HIJARRUBIA, M.J; CASQUEIRO, J; GUTIERREZ, S; FERNANDEZ, F.J; MARTIN J,F. Characterization of the bip gene of *Aspergillus awamori* encoding a protein with an HDEL retention signal homologous to the mammalian BiP involved in polypeptide secretion. *Curr. Genet.* 32, 139-14, 1997.

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

HO, V. T. T.; ZHAO, J.; & FLEET, G. The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 205, 54–67, 2015.

ICCO. (2017). Pests & Diseases. **International Cocoa Organization**. Acesso em: <https://www.icco.org/about-cocoa/pest-a-diseases.html>

INDAH, A. S.; AGUNG WAHYU, S. Investigation of different characters of stomata on three cocoa clones with resistance level difference to VSD (vascular streak dieback) disease. *Journal of Agricultural Science and Technology*, v. 3, n. 4, p. 703–710, 2013.

JAIN, Deepti; KHURANA, Jitendra Paul. Role of pathogenesis-related (PR) proteins in plant defense mechanism. In: **Molecular aspects of plant-pathogen interaction**. Springer, Singapore, p. 265-281. 2018.

KALINSKI. A.; ROWLEY, D.L.; LOER, D.S.; FOLEY, C.; BUTA, G.; HERMAN, E.M. Binding-protein expression is subject to temporal, developmental and stress-induced regulation in terminally differential soybean organs. *Planta* 195:611-621, 1995.

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

KERESZT, A.; LI, D.; INDRASUMUNAR, A.; NGUYEN, C. D.; NONTACHAIYAPOOM, S.; KINKEMA, M.; GRESSHOFF, P. M. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nat Protoc.* 2: 948–952, 2007.

KILARU, A; HASENSTEIN, K.H. Development and Pathogenicity of the Fungus *Crinipellis perniciosus* on Interaction with Cacao Leaves. **Phytopathology**. 95, 101-107, 2005.

KNARR, G.; KIES, U.; BELL, S.; MAYER, M. Interaction of the chaperone BiP with an antibody domain: implications for the chaperone cycle. **Journal of Molecular Biology**, v. 318, p. 611-620, 2002.

KOPP, M. C; LARBURU, N; DURAIRAJ, V; ADAMS, C. J; ALI, M.M.U. UPR proteins IRE1 and PERK switch BiP from chaperone to ER stress sensor. **Nature Structural & Molecular Biology**. 26,1053–1062, 2019.

KRÄHMER, A.; ENGEL, A.; KADOW, D.; ALI, N.; UMAHARAN, P.; KROH, L. W.; &SCHULZ, H. Fast and neat — Determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, 181, 152–159, 2015.

LAEMMLI, U.K. **Nature**. 227,680-685. 1970.

LAWRENCE, J. S.; CAMPÊLO, A. M. F. L.; FIGUEIREDO, J. M. Enfermidades do cacaueiro. II—Doenças fúngicas que ocorrem nas folhas, ramos e tronco. **Agrotrópica**, 3, 1– 14, 1991.

LEAL, G.A.; GOMES, L.H.; ALBUQUERQUE, P. S. B. et al. Searching for *Moniliophthora perniciosus* pathogenicity genes. **Fungal biology**. 114, 842-854, 2010.

LIEBRAND, T. W.; KOMBRINK, A.; ZHANG, Z.; SKLENAR, J.; JONES, A. M.; ROBATZEK, S. Chaperones of the endoplasmic reticulum are required for ve1-mediated resistance to *verticillium*. **Mol. Plant Pathol.** 15, 109–117, 2014.

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

MARTIN, J. T. Role of cuticle in the defense against plant disease. Annual **Review of Phytopathology**, v. 2, n. 1, p. 81–100, 1964.

MARELLI, J. P; MAXIMOVA, S. N; GRAMACHO, K. P; KANG, S; GUILTINAN, M. J. Infection biology of *Moniliophthora perniciosus* on *Theobroma cacao* and alternate solanaceous hosts. ID - 20113401326. **Tropical Plant Biology**. 2, 149–160, 2009.

MEINHARDT, L. W. et al. Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frostypodrot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. **BMC Genomics**. 15, 164, 2014.

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

MEINHARDT, L.W., BELLATO, C.M., RINCONES, J. et al. *In Vitro* Production of Biotrophic-Like Cultures of Crinipellis perniciosa, the Causal Agent of Witches Broom Disease of *Theobroma cacao*. **Current Microbiology**. 52, 191-196, 2006.

MENEZES, S. P; DOS SANTOS, J. L; CARDOSO, T. H. S; PIROVANI, C. P; MICHELI, F; NORONHA, F. S. M; ALVES, A. C; FARIA, A. M. C; DA SILVA GESTEIRA, A. Evaluation of the allergenicity potential of TcPR-10 protein from *theobroma cacao*. **PLoS One**.;7 (6), e37969, 2012.

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

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

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

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAKANO, Yoshiyuki; ASADA, Kozi. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and cell physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E.D.M.N. Principais doenças do cacau e seu manejo. Pg247-252. In: VALLE, R. R. (EDS). **Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacau**. CEPLAC/CEPEC/SEFIS. Brasília, DF. 2012.

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

ORCHARD, H.A.; COLLIN, H.A.; HARDWICK, K.; ISAAC, S. Changes in morphology and measurement of cytokinin levels during the development of witches brooms on cocoa. **Plant Pathology**. 43, 65-72, 1994.

OTHMAN, A.; ISMAIL, A.; ABDUL GHANI, N.; ADENAN, I. Capacidade antioxidante e conteúdo fenólico de grãos de cacau. **Food Chem**. 100, 1523-1530, 2007.

PEDRAZZINI, A.; VITALE, A. The binding protein (BiP) and the synthesis of secretory proteins. **Plant Physiol. Biochem.** 34, 207-216, 1996.

PEREIRA, J. L. Management of Witches' Broom disease of cocoa: a contemporary retrospective. **Cocoa Produces's Alliance**, Lagos, Nigeria: 41p, 2000.

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

PIRES, J. L.; MELO, G. P.; YAMADA, M. M.; GRAMACHO, K. P. Association among sources of resistance to witches broom disease for the increment of the level and durability of the character. **Agrotrópica**. 24, 27-30, 2012.

PIROVANI, Carlos Priminho et al. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. **Electrophoresis**, v. 29, n. 11, p. 2391-2401, 2008.

PLOETZ, R. C. Cacao Diseases: Important Threats to Chocolate Production Worldwide. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1634–1639, 2007.

PRIDMORE, R. D. et al. Genomics, molecular genetics and the food industry. **J. Biotechnol.** 78, 251–258, 2000.

PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of cacao Witches' Broom, biology, epidemiology, and management. **Annu Rev Phytopathol.** 34, 573–594, 1996.

PUNGARTNIK C., DA SILVA A.C., DE MELO S. A, et al. High-affinity copper transport and Snq2 export permease of *Saccharomyces cerevisiae* modulate cytotoxicity of PR- 10 from *Theobroma cacao*. **Mol Plant Microbl Interact.** 22(1):39-51, 2009.

PUNGARTNIK, C., MELO, S.C.O., BASSO, T.C. et al. Reactive oxygen species and autophagy play a role in survival and differentiation of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*. **Fungal Genetics and Biology**. 46, 461-472, 2009.

REIS, P. A. B; ROSADO, G. L; SILVA, L.A; OLIVEIRA, L. C; OLIVEIRA, L. B; COSTA, M. D; ALVIM, F.C; FONTES, E. P. B. The binding protein BiP attenuates stress-induced cell death in soybean via modulation of the N-rich protein-mediated signaling pathway. **Plant Physiol.** 157: 1853–1865, 2011.

RINCONES, J.; SCARPARI, L.M.; CARAZZOLE, M.F. et al. Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the witches broom pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **Mol Plant Microbe Interact** .21, 891-

908, 2008.

RINCONES, J. et al. Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* from various plant hosts in South America. **Mycological Research**. v. 110, n. 7, p. 821–832, 2006.

RODA, A.L. et al. Leaf pubescence mediates the abundance of non-prey food and the density of the predatory mite *Typhlodromus pyri*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 29, p. n. 2, 193-211, 2003.

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

SAIBIL, H.; Chaperone machines for protein folding , unfolding and disaggregation. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 14, n. 10, p. 630–642, 2013.

SCARPARI, L.M.; MEINHARDT, L.W.; MAZZAFERA, P.; POMELLA, A.W.V. et al. Biochemical changes during the development of witches broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. **Journal of Experimental Botany**. 56, 865-877, 2005.

SCHMID, D.; BAICI, A.; GEHRING, H.; CHRISTEN, P. Kinetics of molecular chaperone action. **Science**, v. 263 p.971-973, 1994.

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

SILVA, L. F. et al. Expression of anoxalate decarboxylase impairs the necrotic effectin duced by Nep1-like Protein (NLP) of *Moniliophthora pernicioso* in transgenic tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 24, 839-848, 2011.

SILVA, S. D. V. M. et al. Redescrit o da sintomatologia causada por *Crinipellis pernicioso* em cacaueiro. **Agrotropica**, v. 1, p. 1-23, 2002.

SILVA, S.D.V.M.; MATSUOKA, K. Histologia de *Rinipellis pernicioso* em cacaueiro ssuscet vel e resistente  vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**. 24, 54-59, 1999.

SRIVASTAVA, R; LI, Z. RUSSO, G; TANG, J; BI, R; MUPPIRALA, U; CHUDALAYANDI, S; SEVERIN, A; HE, M; VAITKEVICIUS, S. I. Response to persistent ER stress in plants: A multiphasic process that transitions cells from prosurvival activities to cell death. **Plant Cell**. 30, 1220–1242, 2018.

SISTEMA IBGE de Recuperação Automática –SIDRA: Levantamento Sistemático da Produção Agrícola 2019. Disponível: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>. Acesso em: nov. 2019.

SOUZA, J. T. et al. Cocoa diseases: witches' broom. UMAHARAN, P. (ed.), **Achieving sustainable cultivation of cocoa**, Burleigh Dodds Science Publishing, Cambridge, UK, 2018.

TANG, T.; YU, A.; LI, P.; YANG, H.; LIU, G.; Liu, L. Sequence analysis of the Hsp70 family in moss and evaluation of their functions in abiotic stress responses. **Sci. Rep.** 6, 33650, 2016.

TEXEIRA, P.J.. L. et al. High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **The Plant Cell**, v. 26, n. 11, p. 4245-4269, 2014.

TEXEIRA, P. J. P. L.; THOMAZELLA, D. P. D T.; PEREIRA, G. A. G. Time for Chocolate: Current Understand ingand New Perspectives on Cacao Witches' Broom Disease Research. **PlosPathogen**. 11, 10, 2015.

THOMAS, E.; VAN ZONNEVELD, M.; LOO, J. et al. Present spatial diversity patterns of *Theobroma cacao* L. in the neotropics reflect genetic differentiation in Pleistocene refugia followed by human-influenced dispersal. **PloS one**.7, 2012.

TIMPERIO, A. M., EGIDI, M. G., & ZOLLA, L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). **Journal of Proteomics**. 71, 4, 391–411, 2008.

VALENTE, M. A. S.; FARIA, J. A. Q. A.; SOARES, J. R. L.; RAMOS et al., "The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco," **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p. 533–546, 2009.

VITALE, A, DENECKE, J. The endoplasmic reticulum: gateway of the secretory pathway. **Plant Cell**. 1, 615-628, 1999.

WAN, S; JIANG, L. Endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR) in plants. **Protoplasma**. 253, 753–764, 2016.

WANG, S; NARENDRA, S; FEDOROFF, N. HETEROTRIMERIC, G. Protein signaling in the Arabidopsis unfolded protein response. **Proc Natl Acad Sci USA**. 104: 3817–3822, 2007.

WEI, K. et al. Genome-wide analysis of bZIP-encoding genes in maize. **DNA Research**, v. 19, n. 6, p. 463-476, 2012.

WICKRAMASURIYA, A. M.; DUNWELL, J. M. Cacaobiotechnology: current status and future prospects. **Plant Biotechnology Journal**.16, 4–17, 2018.

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

WOOD GAR.; LASS RA. Cocoa. 4th ed. Wiley-Blackwell. **Longman**. London. 620p, 2008.

WROBEL, R.L.; O'BRIAN, G.R.; BOSTON, R.S. Comparative analysis of BiP gene expression in maize endosperm. **Gene**, v. 204, p.105-113, 1997.

YASUDA, H. et al.; Overexpression of BiP has Inhibitory Effects on the Accumulation of Seed Storage Proteins in Endosperm Cells of Rice. **Plant & cell physiology**, v. 50, n. 8, p. 1532–43, 2009.

XU, G; LI, S; XIE, K; ZHANG, Q; WANG, Y; TANG, Y; LIU, D; HONG, Y; HE, C; LIU, Y. Plant ERD2-like proteins function as endoplasmic reticulum luminal protein receptors and participate in programmed cell death during innate immunity. **Plant J** 72: 57–69, 2012.

ZEESHAN, H.M; LEE, G.H; KIM, H.R; CHAE, H.J. Endoplasmic reticulum stress and associated ROS. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 327-347, 2016.

ZHANG, Y. M.; ZHANG, Z. P.; GUO, T. R. Physiological changes in barley plants under combined toxicity of aluminum, copper and cadmium. **Colloides and Surfaces**. v.57, p.182-188, 2007.

ZHU, J. et al. Molecular cloning, phylogenetic analysis, and expression profiling of endoplasmic reticulum molecular chaperone BiP genes from bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **BMC plant biology**, v. 14, n. 1, p. 260, 2014.