

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



PROTEÍNAS APOPLÁSTICAS DE GENÓTIPOS CONTRASTANTES
DE CACAU ENVOLVIDAS NA DEFESA CONTRA *Moniliophthora*
perniciosa

IVINA BARBOSA DE OLIVEIRA

ILHÉUS - BAHIA- BRASIL
Fevereiro de 2019

IVINA BARBOSA DE OLIVEIRA

**PROTEÍNAS APOPLÁSTICAS DE GENÓTIPOS CONTRASTANTES
DE CACAU ENVOLVIDAS NA DEFESA CONTRA *Moniliophthora
perniciosa***

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

Área de Concentração: Genética e Biologia Molecular.

ILHÉUS - BAHIA- BRASIL
Fevereiro de 2019

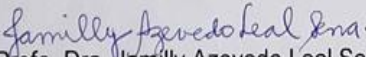
Ivina Barbosa de Oliveira

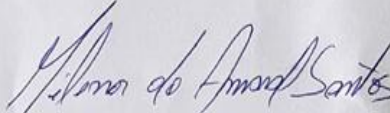
PROTEÍNAS APOPLÁSTICAS DE GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE CACAU
ENVOLVIDAS NA DEFESA CONTRA *Moniliophthora perniciosa*.

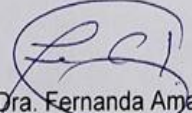
Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e
Biologia Molecular.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2019.


Profa. Dra. Jamilly Azevedo Leal Sena
(PMI - Sec. Educ.)


Profa. Dra. Milena do Amaral Santos
(UESC)


Profa. Dra. Fernanda Amato Gaiotto
(UESC)


Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani
(UESC - orientador)

“À minha mãe Sidinalva e ao meu pai Antônio, por serem meus amores,
minha base e meus maiores exemplos”.

Dedico

AGRADECIMENTOS

“Que darei eu ao Senhor, por todos os benefícios que me tem feito?” (Salmos 116.12). Primeiramente, expresso minha eterna gratidão e todo meu amor ao meu Deus e meu Senhor, por todo o sustento e cuidado. Ai de mim se não fosse o Senhor! Obrigada, paizinho, pela Sua graça, pelo Seu olhar e pelo dom da vida.

Agradeço por toda minha família, a minha base. Obrigada, mainha e painho, pelo amor incondicional e por sempre apoiar as minhas decisões como, em sair de casa e sair do emprego, mesmo sem compreender direito sobre o que faço em meu projeto. Obrigada, por todo amor, cuidado, incentivo e pelas orações, incansáveis orações. Pelas preocupações e por exigir tanto em ligações todos os dias, só pra saber se estou bem. Vocês são meus maiores exemplos e meus maiores amores. Amo vocês!

Agradeço as minhas irmãs, Iara e Ione. Por todo apoio, carinho, incentivo e por me abençoar com os melhores sobrinhos, Júnior, Daiara e Isabella, que sempre me recebem com abraços intensos de amor e de saudade. Amo muito vocês!

Agradeço à minha igreja PIB de Rio Novo, pelo amor e sustento espiritual.

Agradeço imensamente a meu orientador Dr. Carlos Priminho Pirovani, pelo incentivo, pelas ricas contribuições, pela paciência e por sempre acreditar em mim. Obrigada professor, por tanta dedicação na pesquisa científica, sempre à disposição de seus orientados e agregados e pela humildade de conduzir tudo isso, o que te torna um profissional e tanto. Toda minha admiração e gratidão ao senhor.

Aos meus co-orientadores Dra. Karina Peres Gramacho e Dr. Juliano Oliveira Santana, obrigada, pela ajuda sempre que precisei, com toda paciência e disposição, seja em minhas andanças na CEPLAC ou com tratamentos e injeção de *spots* no massas no Centro de Biotecnologia e Genética (CBG). Agradeço por tanto apoio.

Agradeço ao grupo proteômicos, por tantas contribuições, correções, apoio e trocas de experiências, as quais me ajudaram muito em minha vida profissional. Em especial Mona, Geise, Maria, Adinha, Nay, Malu, Bruna, Nath, Keylane, Ariana, Leti e Fernanda, muito obrigada pelo apoio em bancada e pelo grande companheirismo. Vocês são demais!

Agradeço ao grande apoio do estudante de iniciação científica, Igor Moutinho. Obrigada Igor, pela ajuda em tantas coletas e repetições de extração de fluido apoplástico, por todo acompanhamento sem reclamar e lições dispensadas.

Agradeço aos funcionários e professores do CBG. Em especial Dona Jô, que sempre me recebeu com sorrisos e carinho tornando o meu dia mais leve. Ao maior técnico que conheci e criador de piadas, Horlei, que sempre estava à disposição em ajudar, corrigir, calcular e abraçar. Muito obrigada, Horlei! Vou lembrar sempre de você com muito carinho e gratidão (Ps. IV de sódio).

Agradeço aos membros da banca examinadora, Dra. Jamilly Azevedo, Dra. Fernanda Gaiotto e Dra. Milena do Amaral. Obrigada por terem aceitado avaliar este trabalho.

Agradeço as minhas amigas e melhores confidentes, Jana, Mari, Tali e Tay (eternas AGV's) e a agregada Ada. Obrigada, meninas por todo incentivo, amor, orações. Por compreender as minhas ausências, por nossa grande e verdadeira amizade. Vocês são meus presentes de Deus. Amo vocês!

Agradeço a minha família Casa da Mãe Joana, que me acolheu de braços abertos quando cheguei por aqui. Obrigada meninas, Loah e Thay, pela amizade e cuidado que temos uma para com a outra. Obrigada por nossa amizade sincera. Por tantas risadas da madrugada. Obrigada pelo amor, respeito e aprendizado todos os dias. Ah! E obrigada por me apoiar sempre quando deixo, propositalmente, a comida um tempinho a mais para dourá-la (Ps.: nunca a deixo queimar). Amo cada uma de vocês!

Agradeço as minhas colegas e amigas de graduação, Maily e Thaline, pela amizade duradoura, palavras de incentivo e resenhas. Vocês são muito importantes na minha vida!

Agradeço a Universidade Estadual de Santa Cruz e ao programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade e incentivo.

Agradeço as secretárias do PPGGBM Mara e Fabrícia e auxílio de Felipe Bezerra, por toda disponibilidade e ajuda nas muitas vezes que precisei ir à Ceplac.

Agradeço: a FAPESB pela concessão da bolsa.

Ao CNPQ pelo financiamento do projeto de pesquisa.

A todos que, de alguma forma, contribuíram com este trabalho, a minha eterna gratidão!

SUMÁRIO

EXTRATO.....	v
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. GERAL	4
2.2. ESPECÍFICOS	4
3. REFERENCIAL TEÓRICO	5
3.1. <i>Theobroma cacao</i>	5
3.2. <i>Moniliophthora perniciosa</i> e a vassoura-de-bruxa.....	7
3.3. O apoplasto e seu papel na planta	10
3.4. Defesa da planta	13
3.5. Aposto e o reconhecimento do patógeno.....	14
3.6. Isolamento e identificação de proteínas apoplásticas	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. Coleta das folhas de <i>T. cacao</i>	20
4.2. Infiltração e extração do fluido apoplástico das folhas de <i>T. cacao</i>	20
4.3. Extração proteica do fluido apoplástico.....	21
4.4. SDS-PAGE 1D	22
4.5. SDS-PAGE 2D	22
4.6. Análise dos géis	23
4.7. Excisão dos <i>spots</i> , extração dos peptídeos e identificação por espectrometria de massas (MS/MS).....	23
4.8. Busca da identidade das proteínas no banco de dados.....	24
4.9. Anotação da função, predição do peptídeo sinal e localização subcelular das proteínas.....	25
4.10. Metabolismo antioxidativo.....	25
4.10.1. Atividade de Peroxidase do Guaiacol (GPX; EC: 1.11.1.7)	25
4.10.2. Atividade de Peroxidase do Ascorbato (APX; EC:1.11.1.11).....	26
4.11. Bioensaio de germinação dos basidiósporos de <i>M. perniciosa</i> na presença do FA.....	26
5. RESULTADOS	27
5.1. Extração e rendimento de fluido apoplástico para análise proteômica.....	27
5.2. Perfil proteico do fluido apoplástico resolvidos em 1D e 2D-SDS-PAGE	27

5.3.	Avaliação da distribuição dos <i>spots</i> proteicos no gel 2-D quanto a Massa Molecular (MW) e Ponto Isoelétrico (pI).....	29
5.4.	Identificação das proteínas	30
5.5.	Classificação funcional das proteínas de fluido apoplástico de <i>T. cacao</i>	40
5.6.	Predição de localização celular das proteínas de fluido apoplástico de <i>T. cacao</i>	42
5.7.	Metabolismo antioxidativo.....	46
5.7.1.	Atividade da Peroxidase do Guaiacol (GPX).....	46
5.7.2	Atividade da Peroxidase do Ascorbato (APX)	47
5.8.	Efeito do FA na germinação dos basidiósporos de <i>M. pernicioso</i>	48
6.	DISCUSSÃO	52
6.1.	A infiltração a vácuo seguida de centrifugação é eficiente para extração de fluido apoplástico de cacaueiros dos genótipos CCN-51 e Catongo	52
6.2.	Genótipos de cacau contrastantes para a resistência à vassoura de bruxa apresentam perfil proteômico distinto no apoplasto.....	52
6.3.	A maior parte das proteínas detectadas no apoplasto do cacaueiro é envolvida com processos de defesa	54
6.3.1.	O apoplasto do cacau é rico em proteínas de defesa e estresse	55
6.3.2.	Proteínas presentes no apoplasto estão envolvidas em processos metabólicos e oxirredução	59
6.4.	Metabolismo antioxidativo em fluido apoplástico de cacau	60
6.5.	FA de cacau inibe a germinação e causa alterações morfológicas em basidiósporos de <i>M. pernicioso</i>	63
7.	CONCLUSÕES.....	65
	REFERÊNCIAS	66

EXTRATO

OLIVEIRA, Ivina Barbosa de, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2019. **Proteínas apoplásticas de genótipos contrastantes de cacau envolvidas na defesa contra *Moniliophthora perniciosa***. Orientador: Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani. Co-orientadores: Profa. Dra. Karina Peres Gramacho e Dr. Juliano Oliveira Santana.

O apoplasto, que compreende o espaço intercelular e a parede celular dos vegetais, é parte integrante da planta e, os compostos nele presentes formam o fluido apoplástico (FA). Este compartimento desempenha diferentes funções, desde a nutrição até a defesa contra estresses bióticos e abióticos. O fungo *Moniliophthora perniciosa* causador da vassoura-de-bruxa (VB), uma das principais doenças e mais devastadoras do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.), coloniza inicialmente em sua fase biotrófica, o apoplasto. Neste período, o fungo pode permanecer por aproximadamente 60 dias, até mudar para sua segunda fase, a necrotrófica, onde o fungo invade o interior das células causando a morte nos tecidos e, consequentemente grande perda na produção das amêndoas. Portanto, faz-se necessário um maior entendimento sobre a importância do apoplasto na interação *T. cacao*- *M. perniciosa*. Assim, nós realizamos o primeiro mapa proteômico apoplástico de dois genótipos contrastantes para a resistência à VB (CCN51 - resistente e Catongo- suscetível), a partir da extração do FA pelo método de infiltração a vácuo, seguida de centrifugação. Um total de 138 *spots* foi detectado no gel 2-D de CCN-51, onde identificamos 86 proteínas e 62 *spots* no gel do Catongo, onde identificamos 31 proteínas. A maioria das proteínas identificadas em ambos os genótipos estavam envolvidas no processo de estresse e defesa (81% para o CCN-51 e 67% para o Catongo). Dentre elas, destacamos as PR-proteínas detectadas em ambos os genótipos, como: peroxidases, responsável pelo reforçamento da parede celular da planta, β - 1, 3- glucanases e as quitinases, as quais possuem atividade de degradação da matriz da parede celular fúngica. Uma possível candidata a marcador de resistência do genótipo CCN-51, a osmotina, (PR-5) foi identificada. Esta possui atividade antifúngica atuando na inibição da germinação de esporos de diversos fungos. O metabolismo antioxidativo das enzimas APX e GPX em FA de cacau também foram avaliados. A atividade da enzima APX não apresentou diferenças

estatisticamente significativas entre e dentro dos genótipos, por outro lado a enzima GPX mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) para o genótipo CCN-51 (condições de campo- CP) em comparação com as condições controle (CV). No genótipo Catongo (condições de campo), a atividade da enzima apresentou um aumento de 3X com relação ao genótipo em condições controle ($p < 0,01$). Um bioensaio de germinação de basidiósporo do fungo *M. pernicioso* na presença do FA também foi realizado, onde mostramos a inibição de geminação e alterações morfológicas dos basidiósporos em resposta à presença do FA dos genótipos resistentes e suscetível de cacau (CP e CV). Nossos resultados fornecem um maior conhecimento da natureza da defesa da planta no apoplasto na interação *T. cacao*- *M. pernicioso* na fase inicial (biotrófica) da infecção do fungo e, com isso, possibilita ampliar estratégias de controle da VB.

Palavras-chave: Proteoma, fluido apoplástico, *Theobroma cacao*, mecanismo de defesa, planta- patógeno.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Ivina Barbosa de, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, February 2019. **Apoplastic proteins of contrasting cacao genotypes involved in the defense against *Moniliophthora perniciosa***. Advisor: Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani. Advisor Committee Members: Profa. Dra. Karina Peres Gramacho and Dr. Juliano Oliveira Santana.

The apoplast comprises the intercellular space between the cell walls of plants. It is an important part of plants, and the compounds present in it forms the apoplastic fluid (AF). It performs different functions, such as nutrition and defense against biotic and abiotic stresses. The *Moniliophthora perniciosa* fungus causes one of the most devastating diseases in cocoa (*Theobroma cacao* L.), the witch's broom (WB). The WB colonizes initially the apoplast, in its biotrophic phase, and can stay for a period of 60 days until the second phase, the necrotrophic phase. During necrotrophic phase, the fungus invades the inside of the cells causing death of tissues wich leaves to great losses in almonds production. Therefore, it is necessary to understand the importance of the apoplast concerning the interaction between *T. cacao* and *M. perniciosa*. Thus, we performed the first apoplastic proteomic map of two contrasting genotypes for resistance to WB (CCN51 - resistant and Catongo - susceptible), from the AF extraction by the vacuum infiltration method, followed by centrifugation. A total of 138 spots were detected in the CCN-51 2-DE gel, and 62 spots were detected in the Catongo 2-DE gel, where we identified 86 proteins 31 proteins respectively. Most of the proteins identified in both genotypes were involved in stress and defense processes (81% for CCN-51 and 67% for Catongo). Among them, we highlight the PR-proteins detected in both genotypes: peroxidases, responsible for the reinforcement of the plant's cell wall, and β -1, 3-glucanases and chitinases, which have degradation activity of the fungal cell wall matrix. A possible candidate for resistance marker of the CCN-51 genotype, the osmotin (PR-5), was identified. It has antifungal activity, acting on the inhibition of spore germination of various fungi. The antioxidative metabolism of APX and GPX enzymes in cocoa's AF were also evaluated. The APX enzyme did not show statistically significant differences between and within the genotypes; on the other hand, the GPX enzyme showed a significant increase ($p < 0.05$) for the CCN-51 genotype (field conditions) compared to the same

genotype in control conditions. In the Catongo genotype (field conditions) the enzyme activity showed a 3X increase compared to the genotype under control conditions ($p < 0.01$). A bioassay of basidiospore germination of *M. perniciosa* fungus in the presence of AF was also performed. We showed the inhibition of germination and morphological changes of basidiospores in response to the presence of AF from resistant and susceptible cacao genotypes (under field and control conditions). Our results provide a better understanding of the plant defense mechanisms, in the apoplast, regarding to the interaction between *T. cacao* and *M. perniciosa* during the initial (biotrophic) phase of the fungus infection. Hence, this allows to expand control strategies of the WB.

Keywords: Proteome, apoplastic fluid, *Theobroma cacao*, defense mechanism, plant-pathogen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases de desenvolvimento do fungo <i>Moniliophthora perniciosa</i>	9
Figura 2. Diagrama mostrando como o patógeno é reconhecido no apoplasto..	16
Figura 3. Perfil proteico do fluido apoplástico de genótipos de cacau elicitados pelo fungo <i>M. perniciosa</i> em SDS PAGE..	27
Figura 4. Perfil proteico bidimensional do fluido apoplástico de genótipos de <i>T. cacao</i>	28
Figura 5. Distribuição dos <i>spots</i> proteicos resultantes de fluido apoplástico de CCN-51 e Catongo, detectados no mapa 2D, de acordo com a peso molecular (MW).	29
Figura 6. Distribuição dos <i>spots</i> proteicos resultantes de fluido apoplástico de CCN-51 e Catongo, detectados no mapa 2D, de acordo com o ponto isoelétrico (pI) (3-10 NL).	30
Figura 7. Caracterização por processos biológicos das proteínas identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) no apoplasto do genótipo de <i>T. cacao</i> CCN-51, em condições de campo.	41
Figura 8. Caracterização por processos biológicos das proteínas identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) no apoplasto do genótipo de <i>T. cacao</i> Catongo, em condições de campo	41
Figura 9. Atividade da Peroxidase do Guaiacol (GPX), em fluido apoplástico de genótipos de cacau em condições controle e de campo: Catongo- suscetível e CCN-51- resistente à vassoura de bruxa..	47

Figura 10. Atividade da Peroxidase do Ascorbato (APX), em fluido apoplástico de genótipos de cacau em condições controle e de campo: Catongo- susceptível e CCN-51- resistente à vassoura de bruxa..	48
Figura 11. Germinação de esporos de <i>M. pernicioso</i> na presença de fluido apoplástico 4h após a inoculação..	49
Figura 12. Porcentagem de germinação dos basidiósporos de <i>M. pernicioso</i> na presença de FA de genótipos contrastantes de <i>T. cacao</i>	50
Figura 13. Porcentagem de inibição da germinação dos basidiósporos de <i>M. pernicioso</i> na presença de FA de genótipos contrastantes de <i>T. cacao</i>	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas do fluido apoplástico identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) do genótipo CCN-51 de <i>T. cacao</i> , em condições de campo.	32
Tabela 2. Proteínas do fluido apoplástico identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) do genótipo catongo de <i>T. cacao</i> , em condições de campo.	38
Tabela 3. Predição de localização celular das proteínas de fluido apoplástico do genótipo CCN-51 de <i>T. cacao</i>	43
Tabela 4. Predição de localização celular das proteínas de fluido apoplástico do genótipo catongo de <i>T. cacao</i>	45

1. INTRODUÇÃO

O termo apoplasto foi criado em 1930 e primeiramente definido como “um único meio contínuo de sistema de transporte de água” no vegetal, pelo cientista alemão E. Münch (SAKURAI, 1998). Mais tarde, entendendo sobre a grande importância do apoplasto para planta foi então, definido como compartimento extracelular que compreende a parede e os espaços intercelulares (DIETZ, 1997; DANI et. al., 2005; SADAVA, et. al., 2009; AGRAWAL et. al., 2010). O apoplasto é considerado responsável por desempenhar diversas e importantes funções no desenvolvimento e na fisiologia da planta como, rota de transporte, manutenção da parede celular, sinalização, homeostase, desintoxicação e respostas de defesa a estresses (SAKURAI, 1998; SATTELMACHER, 2001; AGRAWAL et. al., 2010; DELANOIS et al., 2014). Portanto, o apoplasto é um espaço muito dinâmico envolvido em importantes interações moleculares entre planta e patógeno atuando de forma essencial no reconhecimento e na cascata de respostas do vegetal contra importantes fitopatógenos (ZHANG et. al., 2009; AGRAWAL et. al., 2010; DELAUNOIS et al., 2013; LI et al., 2016).

Compostos presentes no apoplasto formam o FA, como água, açúcares e muitas proteínas solúveis, estas são importantes no processo de infecção (RAMANJULU et al., 1999; SOARES et al., 2007). A caracterização de proteínas apoplásticas que podem estar solúveis ao FA ou ligadas à parede celular, ainda são escassas devido ao desafio em sua obtenção, ou seja, a extração e identificação de proteínas do espaço extracelular são caracterizadas por dificuldades ao requerer o não rompimento da parede e da membrana celular a fim de evitar contaminação do simplasto, espaço interno das células (LEE et al., 2004; DELANOIS et. al., 2014). Além do mais, a concentração de proteínas no apoplasto é inferior a presente intracelularmente e, conseqüentemente torna o processo de identificação ainda mais desafiador (QUIRINO et al., 2010).

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) foi uma das culturas mais importantes para o Brasil, principalmente para o sul da Bahia no século XIX (COSTA; SOARES, 2016). Teve sua produção afetada de forma drástica desde 1989 com a chegada do fungo *Moniliophthora perniciosa* (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005), causador da doença vassoura-de-bruxa (VB). O fungo *M. perniciosa* é hemibiotrófico e, portanto

possui duas fases em seu ciclo de vida: a fase inicial, parasítica ou monocariótica, a qual possui crescimento biotrófico intercelular nos tecidos causando alterações fisiológicas e morfológicas e, a segunda fase, necrotrófica ou saprofítica, onde o fungo invade o espaço interno das células ocasionando a morte dos tecidos (EVANS, 1980; MEINHARDT et al., 2008). A VB desde sua chegada à Bahia foi responsável pela maior crise econômica atingindo todo o estado e, conseqüentemente o país, pois, nesta época, o Brasil passou de exportador para importador de cacau (MEINHARDT et al., 2008; CALDAS; PERZ, 2013). Trabalho envolvendo a fase biotrófica do fungo *M. pernicioso* concluiu que este, ao invadir o apoplasto, pode permanecer neste espaço em torno de 40-60 dias até progredir para sua fase necrotrófica (CEITA et al., 2007). Por consequência, acredita-se que esta fase seja crucial para o avanço ou não da instalação da doença (PIROVANI et al., 2008), visto que proteínas presentes podem atuar diretamente ou de forma indireta no combate à infecção de *M. pernicioso* em *T. cacao*. Apesar de desafiador e tendo em vista a importância das proteínas nesse espaço subcelular, faz-se necessário seu conhecimento e o uso de protocolos específicos que evitem acúmulo de contaminantes e favoreça rendimentos consideráveis para seu estudo.

O principal trabalho envolvendo apoplasto de *T. cacao* foi desenvolvido por meio da técnica de infiltração a vácuo seguida de centrifugação, a fim de extrair o fluido apoplástico de folhas de cacau. A força centrífuga ideal comprovada foi de 3000 g, pois a partir de 4000 g, mesmo com um aumento do rendimento do fluido apoplástico, favorecia o aumento da contaminação do meio intracelular (PIROVANI et al., 2008). Apesar da importância do trabalho supracitado, o qual fornece um importante suporte a fim de compreender as respostas da planta por meio de estudos do espaço intercelular de *T. cacao* e seus constituintes, as proteínas apoplásticas envolvidas nesta interação não foram identificadas. Diante disto, nossa proposta, se configura em um trabalho promissor dentro da pesquisa científica que visa elucidar a importância do apoplasto na proteção do cacaueiro contra ataques do fungo *M. pernicioso*.

Com isso, sabendo que o apoplasto e seus constituintes são essenciais para o cacaueiro na interação com *M. pernicioso* e a falta de trabalhos envolvendo esta interação neste espaço subcelular, nosso trabalho objetiva caracterizar as diferenças no perfil proteico do fluido apoplástico de dois genótipos contrastantes quanto à

resistência à vassoura-de-bruxa, o CCN-51 (resistente) e Catongo (suscetível) e analisar o efeito do fluido apoplástico sobre a germinação de esporos do fungo *M. pernicioso*, a fim de fornecer conhecimento das respostas de defesa da planta para um compreensivo entendimento da interação patógeno-hospedeiro.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

- Caracterizar as diferenças no perfil proteico do fluido apoplástico (FA) de dois genótipos contrastantes, o CCN-51 (resistente) e Catongo (suscetível) quanto à resistência à vassoura-de-bruxa (VB) e analisar o efeito do FA sobre a germinação de esporos do fungo *Moniliophthora perniciosa*.

2.2. ESPECÍFICOS

- Constatar proteínas diferenciais presentes no apoplasto de genótipos contrastantes de cacau quanto à resistência à VB;
- Analisar o metabolismo antioxidativo do FA das variedades de cacau CCN-51 (resistente) e Catongo (suscetível) em condições de campo (CP) e em condições controladas em casa de vegetação (CV);
- Avaliar a germinação dos basidiósporos do *M. perniciosa* na presença do FA de CCN51 e Catongo em CP e CV.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. *Theobroma cacao*

Theobroma cacao foi descrito por Linneu em 1753 chamando-o de “manjar dos deuses” (VALENZUELA, 2007; FERREIRA et al., 2013; ceplac.gov.br), originou-se na América do Sul (MOTAMAYOR et al., 2002; WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2018). É uma espécie lenhosa tropical preferencialmente alógama (ALMEIDA; VALLE, 2007; FERREIRA et al., 2013) e foi primeiramente classificada na Família Sterculiaceae (CUATRECASAS, 1964) e reclassificada na família Malvaceae (ALVERSON et al., 1999).

A espécie *T. cacao* pode ser dividida em três grandes grupos de acordo com características morfológicas, genéticas e localização geográfica: Criollo, Forastero e Trinitário. O grupo Criollo espalhou-se em direção ao norte, penetrando na América Central e no sul do México. Produz frutos grandes com superfície enrugada e sabor mais suave e frutados, porém é menos resistente às pragas (SOUNIGO et al., 2003; FERREIRA et al., 2013), tornando-se menos popular entre os produtores de cacau (WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2018). O Forastero primeiro a ser cultivado, originou-se da Bacia Amazônica. Geralmente possui sementes escuras, porém podem ser também brancas como ocorre na variedade Catongo brasileiro. Esse é considerado o verdadeiro cacau brasileiro e, apesar de possuir sabor mais amargo e adstringente (FERREIRA et al., 2013; COSTA; SOARES, 2016) essa variedade é responsável pela maior parte de produção mundial de chocolate, pelo seu alto grau de rendimento e de resistência a muitas pragas, exceto *M. pernicioso* (WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2018). O Trinitário é considerado um híbrido produzido a partir do cruzamento entre as variedades Criollo e Forastero. Teve origem em Trinidad e hoje é cultivado em diversos continentes, pois possui caráter de resistência às doenças (ALMEIDA; VALLE, 2007; FERREIRA et al., 2013; WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2018). No Brasil foi introduzido em programas de melhoramento, como os híbridos TSH e TSA (FERREIRA et al., 2013).

A cultura do cacau possui grande importância econômica e social para o Brasil e para o mundo. As amêndoas de cacau são a principal matéria-prima para a

produção do chocolate e uma gama de produtos, como o cacau em pó, manteiga de cacau, licor de chocolate, sorvetes e produtos de panificação (FERREIRA et al, 2013; BEG et al., 2017; WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2008). O cacau também possui aplicações cosméticas e farmacêuticas, como na ajuda de pacientes magros a aumentar peso, no estímulo do sistema nervoso de pessoas fracas e no auxílio da digestão e da função renal (BEG et al., 2017). Além disso, na República Dominicana, bebidas de chocolate são utilizadas no tratamento de dores de garganta, anemia e doenças gastrointestinais; no Panamá alguns índios acreditam que a utilização de bebidas de chocolate evita a incidência de doenças cardíacas e de câncer (BEG et al., 2017). Isso se dá devido à capacidade anti-inflamatória dos flavonoides que estão presentes em quantidades elevadas no cacau considerando assim, como uma fonte alternativa na prevenção de doenças cardiovasculares e câncer, além disso, sua casca é uma fonte rica de vitamina D. Por isso, a ingestão de chocolate (principalmente amargo) é recomendada de forma balanceada (BEG et al., 2017; GOY et al, 2016; WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2018).

Enquanto a demanda por cacau está cada vez mais aumentando, a produção global está sendo considerada um risco, podendo ocorrer um provável declínio até 2020 (WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2018). Por outro lado, alguns países são promissores no cultivo do cacau, como a Costa do Marfim que atingiram 505.000 toneladas de produção de amêndoas de cacau desde o início da safra 2017/18, porém praticamente inalteradas em relação às 503,000 toneladas no mesmo período do ano anterior (WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2018; ICCO, 2018).

No Brasil, o cultivo de cacau impulsionou no século XVII, tendo o ápice no século XX quando liderou a produção mundial. No sul da Bahia, local de uma importante faixa de Mata Atlântica, o cacaueiro encontrou condições climáticas e solos ideais para a expansão do cultivo. O plantio de cacau no sul Bahia ocorre em um sistema denominado Cabruca, cultivo de cacau implantado no sub-bosque de forma descontínua e circundado por vegetação natural possibilitando o sombreamento por diferentes árvores da Mata Atlântica original (ROCHA, 2008; LOBÃO et al. 2004). Este sistema foi considerado por Lobão et al. (2004) como um sistema agrossilvicultural, que além de gerar recursos financeiros apresenta vantagens sustentáveis como a conservação de alguns exemplares arbóreos, da

fauna diversificada e de recursos hídricos regionais, conferindo uma importância ecológica para esta cultura (LOBÃO et al. 2004).

No final do século XIX, a cacauicultura foi considerada como uma importante atividade econômica que proporcionou o desenvolvimento e riqueza para região e o crescimento do Estado baiano por mais de um século (COSTA; SOARES, 2016). Atualmente, segundo dados do IBGE (2018), a safra de cacau na Bahia aumentou de 83.869 toneladas no ano de 2017 para 122.568 toneladas no ano de 2018.

Embora a Bahia seja ainda considerada a maior produtora de cacau do Brasil, essa cultura enfrentou diversos ciclos críticos desde a década de 1930 quando o país passou por uma série de crise econômica (CALDAS; PERZ, 2013). Apesar do sul da Bahia ter liderado o cultivo de cacau nos anos de 1976 a 1987 (BENJAMIN, 2016), sua produção caiu drasticamente quando iniciou a principal crise enfrentada pelo cacau no estado com a chegada da vassoura-de-bruxa (VB), registrada pela primeira vez em 1989 no município de Uruçuca. A doença, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, acarretou uma queda chegando a causar perdas de até 90% na produção de amêndoas e também ameaçando a estabilidade ecológica devido à substituição de cacauais por pastagens e, conseqüentemente perda de árvores nativas presentes no sistema cabruca (ROCHA, 2008; CALDAS; PERZ, 2013), afetando assim, não só o fornecimento da amêndoa de cacau, mas causando impacto sobre a conservação da paisagem (MEINHARDT et al., 2008).

3.2. *Moniliophthora perniciosa* e a vassoura-de-bruxa

Moniliophthora perniciosa foi primeiramente descrito como *Marasmius pernicius* por Stahel (1915) e posteriormente como *Crinipellis perniciosa* (Stahel) (SINGER, 1942). A partir de análises filogenéticas de regiões gênicas o fungo foi reclassificado recebendo o nome atual proposto por Aime e Phillips-Mora (2005). É um fungo pertencente à classe dos Basidiomicetos, ordem Agaricales, família Marasmiaceae (PURDY, et al. 1996; AIME; PHILLIPS-MORA, 2005; OLIVEIRA; LUZ, 2005).

A doença VB foi primeiramente descoberta no Suriname em 1895. Mais tarde foi detectada em muitos países da América do Sul e Central. Sua chegada ao sul da Bahia caracterizou-se por uma rápida disseminação, já que o fungo encontrou

condições ambientais favoráveis tornando-se responsável pela maior doença ocorrida na cacauicultura do estado (PURDY, et al. 1996; OLIVEIRA; LUZ, 2005; ROCHA, 2008). Em pouco tempo, a doença se espalhou para região causando importantes danos, como detectado no município de Uruçuca que enfrentou uma queda em 1990 equivalente a 75% de área cultivada e 70% de produção. Danos estes, que contribuíram para transformar o Brasil de exportador para importador de cacau (MEINHARDT et al., 2008; CALDAS; PERZ, 2013).

M. perniciosa possui um potencial destrutivo, atacando o equilíbrio hormonal do cacau e causando sintomas como hipertrofia e hiperplasia. O início da infecção se dá pelos basidiósporos que são produzidos pelos basidiocarpos, que possuem forma de cogumelos rosados (Figura 1A). Os basidiósporos dispersam pela ação do vento, principalmente em períodos com umidade alta. Em contato com tecidos da planta, principalmente tecidos jovens, os basidiósporos penetram por aberturas naturais, como os estômatos e inicia o processo de infecção e instalação da doença (MEINHARDT et al., 2008). Caracterizado como hemibiotrófico, o fungo *M. perniciosa* possui duas fases em seu ciclo de vida. A fase inicial (parasítica, monocariótica) apresenta a formação de hifas monocarióticas com ausência de grampos de conexão e crescimento biotrófico intercelular nos tecidos do hospedeiro (Figura 2B), consequentemente causando alterações como hipertrofia e hiperplasia, perda de dominância apical e formação de hastes anormais com aparência de “vassoura verde” (Figura 2C). A segunda fase, chamada de necrotrófica ou saprofítica, é caracterizada por micélio dicariótico e hifas com grampos de conexão o qual invade o meio intracelular levando a morte dos tecidos e formando uma estrutura denominada de “vassoura seca” (Figura 2D), onde se alimenta da matéria orgânica morta (EVANS, 1980; MEINHARDT et al., 2008).

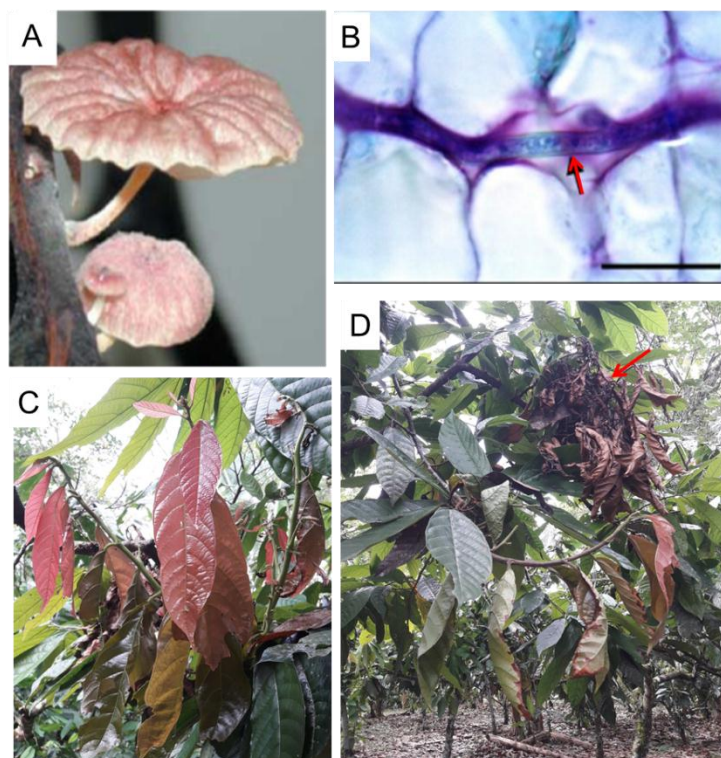


Figura 1. Fases de desenvolvimento do fungo *Moniliophthora perniciosa*. A: Basidiocarpos, corpo de frutificação do *M. perniciosa*, em uma vassoura seca (MEINHARDT et al., 2008). B: Hifa monocariótica no apoplasto de meristema de cacaueiro representando a fase biotrófica (TEIXEIRA et al., 2014). C: Estágio de vassoura verde da doença (Fonte: Acervo do autor). D: Necrose dos tecidos (vassoura-de-bruxa-seca) representando a fase necrotrófica (Fonte: Acervo do autor).

Interesses por uma compreensão maior sobre a interação do cacau e o fungo *M. perniciosa* existem desde a década de 90, quando a doença VB começava a avançar e juntamente com ela as consequências na produção das amêndoas. Algumas medidas foram tomadas a partir de 1990 para conter a doença. Procedimentos agrícolas foram propostos pelo Centro de Pesquisas (CEPEC) da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), como aplicação de fungicidas e implantação de variedades resistentes (FIORAVANTI; VELHO, 2011; CALDAS; PERZ, 2013), técnicas realizadas por pequenos produtores, como reforço da adubação e antecipação da poda, de modo a coletar o fruto no primeiro semestre do ano, quando o ataque do fungo é menos intenso, além disso, iniciaram-se

pesquisas organizadas por um pesquisador da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) no ano de 2000 a fim estudar o genoma do fungo e com isso nortear melhores estratégias de combate (FIORAVANTI; VELHO, 2011). Desde então, muitos trabalhos têm sido realizados em torno do patossistema *T. cacao*- *M. pernicioso* podendo destacar, alguns grupos de pesquisadores que atualmente desenvolvem trabalhos relevantes na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC, Ilhéus-Bahia) em busca de respostas a nível genômico (ALMEIDA et al., 2017; FREIRE et al., 2017; PEREIRA et al., 2017), proteômico (MARES et al., 2016; 2017) respostas fisiológicas (FREITAS et al., 2015), dentre outros.

3.3. O apoplasto e seu papel na planta

O cientista alemão E. Münch em 1930 notou que além do xilema, havia outro compartimento cuja função era transportar água no interior do vegetal, surgindo assim o termo apoplasto (SAKURAI, 1998), palavra que vem grego *apo*, “distante de”; *plast*, “material vivo” (SADAVA et al., 2009). De uma forma geral, a planta pode ser dividida basicamente em um compartimento intracelular ou simplasto, onde contém todas as estruturas protoplasmáticas e o extracelular ou apoplasto (De ALMEIDA, 2001), que constitui os espaços intercelulares e a parede celular (DIETZ, 1997; DANI et. al., 2005; SADAVA, et. al., 2009; AGRAWAL et. al., 2010).

O apoplasto pode ser definido como um componente que liga o ambiente ao protoplasto, desempenhando um importante papel na fisiologia e desenvolvimento do vegetal, pois neste espaço a planta libera produtos essenciais relacionados ao desenvolvimento e à tolerância a estresses ambientais, como proteínas e metabólitos constituindo assim, o fluído apoplástico (FA), o qual desempenha um papel importante e crítico na interação da planta com o ambiente (ZHANG et. al., 2009; AGRAWAL et. al., 2010).

O FA contém nutrientes como, proteínas, enzimas, metabólitos, íons, água e outras substâncias que podem ser constitutivamente expressas ou induzidas, como aquelas que somente são produzidas em resposta a imunidade inata da planta (AGRAWAL et al., 2010; DELANOIS et. al., 2014). As proteínas extracelulares

podem estar solúveis no FA ou ligadas à parede celular da planta (RAMANJULU et al., 1999; SOARES et al., 2007).

Assim, o apoplasto está envolvido em diversas funções importantes para o vegetal como, regulação de crescimento, manutenção da parede celular, rota de transporte, homeostase, adesão célula a célula, trocas gasosas e em processos envolvidos na defesa a estresse biótico e abiótico e contra a dessecação (SAKURAI, 1998; SATTELMACHER, 2001; DELANOIS et al., 2014). Sacurai (1998) compara a importância do apoplasto para planta como nosso ambiente interno que consiste em sangue, linfa e fluido de tecido, para nosso corpo.

Estudos realizados por Guerra-Guimarães et al. (2015) com o apoplasto de folha de *Coffea arabica* na interação com fungo *Hemileia vastatrix*, causador da ferrugem alaranjada, mostraram o efeito de estresse abiótico e biótico no vegetal. Na interação *C. arabica*- *H. vastatrix* crescidas em condições de estufa identificaram 195 proteínas no fluido apoplástico, sendo em sua maioria envolvidas no metabolismo da parede celular e na defesa da planta. Em outra análise envolvendo genótipos resistentes e suscetíveis, revelaram 210 *spots* polipeptídicos e as proteínas identificadas estavam envolvidas na degradação de proteínas, metabolismo da parede celular e defesa, principalmente as glico-hidrolases, proteases de serina e proteínas PR (GUERRA-GUIMARÃES et al., 2015; GUERRA-GUIMARÃES; RICARDO, 2015).

Outros trabalhos também demonstraram o papel importante do apoplasto nas respostas de defesa da planta. A maioria das proteínas encontradas no FA em videira estava relacionada ao estresse, metabolismo e remodelação da parede celular (DELAUNOIS et al., 2013). As proteínas apoplásticas em raízes do algodoeiro estavam relacionadas ao metabolismo das espécies reativas de oxigênio (ROS) e na resposta de defesa do vegetal contra o fungo *Verticillium dahliae* (LI et al., 2016).

Modificações do conteúdo apoplástico também têm sido observadas em resposta ao estresse abiótico no vegetal. Em cevada (*Hordeum vulgare*) (RAMANJULU et al., 1999), em tabaco (*Nicotiana tabacum*) (DANI et al, 2005) e em arroz (*Oryza sativa*) (GUO e SONG, 2009) o conteúdo proteico apoplástico foi influenciado em resposta a estresse salino. Em álamo (*Populus* spp) as proteínas identificadas permitiam a sobrevivência da planta sob estresse hídrico

(PECHANOVA et al. 2010). O estresse por metal pesado que foi demonstrado em feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) tratado por manganês induziu a produção de peroxidases e outras proteínas solúveis (FECHT-CHRISTOFFERS et al., 2003). O estresse salino influenciou na alcalinização apoplástica em milho (*Zea mays*) (PITANN et al., 2009) e em *Vicia faba* (GEILFUS et al., 2015).

O apoplasto é o local onde ocorre o contato inicial entre planta e patógenos, sendo determinante para a colonização ou não de seu hospedeiro (SPERSCHNEIDER et al., 2018). O fungo *M. pernicioso* ramifica no apoplasto do *T. cacao* no primeiro estágio da doença, ou vassoura verde, caracterizando a fase biotrófica ou parasítica (PURDY; SCHMIDT, 1996). Isso acarreta alterações bioquímicas, como o aumento de alcaloides, compostos fenólicos e taninos para tentar eliminar o fungo, seguido de aumentos nas concentrações de etileno e malondialdeído (MDA), o que demonstra estresse oxidativo no apoplasto de plantas infectadas comparadas com as não infectadas (SCARPARI et al., 2005). O fungo *M. pernicioso* permanece em sua fase parasítica no apoplasto por cerca de 40 a 60 dias (CEITA et al., 2007), sendo assim, pode-se considerar este espaço como um campo de batalha molecular devido às interações entre cacau- *M. pernicioso* e, portanto, a fase parasítica do fungo é um período determinante para o avanço ou não da instalação da doença (PIROVANI et al., 2008).

Para um maior entendimento da interação *M. pernicioso*- *T. cacao*, muitos estudos têm sido realizados, os quais envolvem a fase biotrófica da doença. Por outro lado, o conhecimento sobre o apoplasto do cacau continua escasso. O primeiro mapa proteômico do *M. pernicioso* foi realizado em resposta ao FA de cacau. Dois isolados do fungo (553, menos agressivo e 565, mais agressivo) e duas variedades de cacau contrastantes para doença VB (Catongo, genótipo susceptível e TSH1188, genótipo resistente) foram utilizados. As análises mostraram que constituintes do fluido apoplástico induziram o remodelamento proteico do *M. pernicioso* de acordo com o seu grau de agressividade (CAMILLO, 2013). Pirovani (2008), em sua tese de doutorado, avaliou a germinação de esporos do fungo *M. pernicioso* na presença do FA de cacau de dois genótipos contrastantes para doença VB (Catongo e TSH1188) de plantas controle (inoculados em água) e de plantas infectadas pelo fungo às 72 horas após a inoculação. A inibição da germinação para o fluido das plantas da variedade Catongo controle foi de 23% e

das plantas elicitadas foi de 1%. Por outro lado, para o fluido da variedade resistente (TSH1188) houve uma inibição de 13% e 50% da germinação em plantas controle e elicitadas, respectivamente, indicando acúmulo de compostos de defesa presentes no apoplasto do genótipo resistente sob interação com o patógeno (PIROVANI, 2008).

3.4. Defesa da planta

A convivência durante milhões de anos entre plantas e microrganismos favoreceu o desenvolvimento de um sistema de comunicação, onde ocorrem trocas de sinais entre si sendo fundamental para adaptabilidade das espécies ao estresse, pois leva conseqüentemente a uma pressão seletiva (DALIO, 2013).

As plantas estão expostas a vários fatores bióticos na natureza, como a diversas classes de microrganismos fitopatogênicos, tais como, nematoides, fungos, bactérias e insetos. Assim, em função da incapacidade de locomoção, as plantas evoluíram mecanismo de defesa para driblar e evitar a entrada de invasores contornando situações desfavoráveis e com isso, garantindo a sua sobrevivência (AGRIOS, 1997; PIETERSE et al., 2005; MELLO; SILVA-FILHO, 2002; MENOSSE et al., 2008). Apesar das plantas serem incapazes de esconder ou escapar de ataques de patógenos e não possuírem um sistema de defesa imune adaptativo como os animais, como a produção dos linfócitos T e B e células de defesas móveis, ainda assim, elas podem reconhecer a presença de patógenos e montar respostas de defesa eficientes que garanta o crescimento vegetativo e o sucesso reprodutivo minimizando danos correntes e futuros pelo invasor (OSBOURN, 2001; NÜRNBERGER et al., 2004; CHISHOLM et al., 2006; DALIO, 2013).

A planta, ao perceber a presença do invasor, aciona uma cascata de sinais ativando o mecanismo de defesa (PINTO et al., 2011). Para que o patógeno consiga se estabelecer no hospedeiro, é necessário ultrapassar barreiras pré-formadas ou constitutivamente expressas pela planta, como barreiras estruturais e químicas, as quais são formadas independentes da ação de patógenos, como por exemplo, cutícula e alguns compostos antimicrobianos, respectivamente (STANGARLIN et al., 2011; ZHANG et al., 2009).

Estudos têm demonstrado a importância de compostos secretados constitutivamente na superfície foliar que contribuem na defesa basal da planta. Proteínas antimicrobianas denominadas filoplaninas foram identificadas no filopiano em *Nicotiana tabacum* conferindo resistência ao fungo *Peronospora tabacina* (SHEPHERD et al., 2005). Recentemente, foi demonstrada a expressão em tricomas glandulares curtos de uma filoplanina de *T. cacao*, em diferentes tecidos, mas principalmente em meristemas, caracterizando a primeira filoplanina identificada em planta perene (FREIRE et al., 2017). Apesar dessa barreira de proteção do vegetal na tentativa de impedir a entrada do patógeno, alguns ultrapassam essa primeira barreira e assim, conseguem penetrar em seus hospedeiros e produzir vários graus de infecção (TEIXEIRA, 2011). Com isso, é ativada na planta a produção de compostos de defesa pós-formados ou induzíveis, podendo estar ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, porém os níveis são elevados principalmente depois da invasão do patógeno (STANGARLIN et al., 2011). Essa barreira é dita como bioquímica, onde a planta desenvolve como parte de sua defesa, liberando algumas substâncias para inibir o desenvolvimento do patógeno (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008) como, por exemplo, as proteínas PR (*pathogenesis-related*), que são responsáveis pelas maiores mudanças quantitativas relacionadas às proteínas solúveis durante as respostas de defesa (STINTIZI et al., 1993) e pode estar presentes no vacúolo, parede celular e/ou apoplasto (STANGARLIN et al., 2011).

3.5. Apoplasto e o reconhecimento do patógeno

O patógeno ao conseguir penetrar nos tecidos da planta estará sujeito ao reconhecimento na membrana plasmática (NÜRNBERGER et al., 2004). Tal evento ocorre quando moléculas indutoras das respostas se ligam às moléculas receptoras que podem estar ligadas à membrana celular do vegetal. As moléculas indutoras podem ser de origem endógena, fragmentos liberados pela própria planta ou exógena, fragmentos ou moléculas liberados pelo invasor. Ao serem reconhecidos pelas moléculas receptoras, os genes relacionados à defesa das plantas são ligados (PINTO et al., 2011).

Para o estabelecimento do patógeno em seu hospedeiro é preciso atravessar o apoplasto local onde, importantes reações e processos regulatórios ocorrem de forma natural ou são induzidas devido ao reconhecimento do patógeno (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2018). Esse reconhecimento ocorre por meio de sensores apoplásticos chamados de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que são proteínas transmembranas conservadas com domínio extracelular rica em leucina (LRRs) ou motivo de lisina (Lysm) e um domínio de quinase intracelular (JASHNI et al., 2015; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2018). As PRRs se localizam geralmente na superfície da membrana celular e reconhecem os padrões moleculares associados ao patógeno (MAMPs ou PAMPs), conhecidos como elicitores, tais como a quitina, um componente da parede celular dos fungos ou flagelina bacteriana. Após esse reconhecimento inicial, leva à imunidade desencadeada pelo MAMP (PTI) acionando as defesas basais da planta (BOLLER; FELIX, 2009; DELAUNOIS et al., 2014; JASHNI et al., 2015; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2018), como mudanças na composição da parede celular e acúmulo de compostos antimicrobianos (DOEHLEMAN; HEMETSBERGER, 2013). Algumas moléculas provenientes da própria planta também podem ser reconhecidas pelas PRRs desencadeando respostas imunes, as chamadas de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), como moléculas liberadas devido a danos na parede celular. Patógenos mais adaptados podem inibir a interação MAMP-PRR, secretando proteínas efetoras e suprimindo ou comprometendo o MTI e com isso, facilitando suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS). Por outro lado, essas moléculas efetoras também podem estimular a imunidade desencadeada por efector (ETI) em plantas que possuem proteínas de resistência (R) resultando no segundo nível de defesa da planta (Figura 2) (DALIO, 2013; DOEHLEMAN; HEMETSBERGER, 2013; DELAUNOIS et al., 2014; JASHNI et al., 2015; BOLLER; FELIX, 2009).

Dalio (2013) defende que o patógeno desenvolve novas moléculas efetoras na tentativa de suprimir as respostas da planta, por consequência a planta desenvolve novas moléculas de reconhecimento em seu favor sugerindo uma co-evolução contínua e, conseqüentemente uma “corrida armamentista” na interação planta-patógeno.

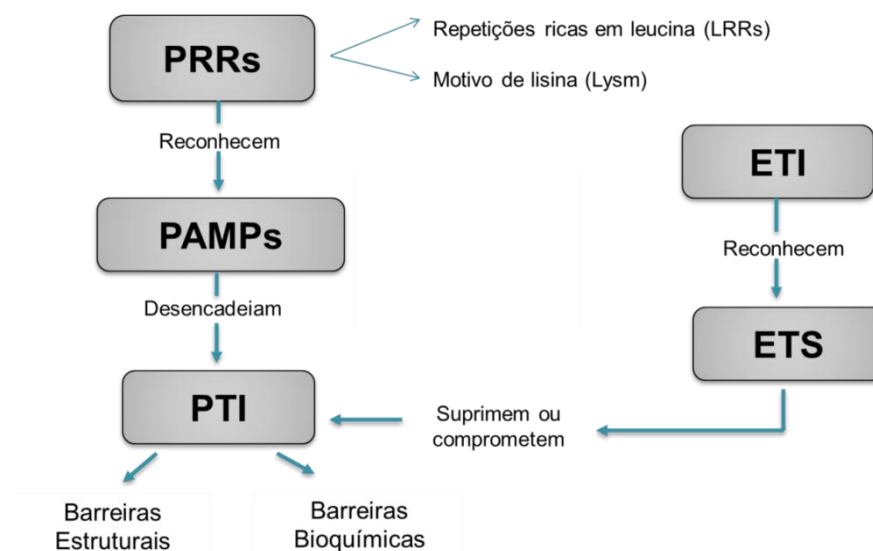


Figura 2. Diagrama mostrando como o patógeno é reconhecido no apoplasto. PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrões; PAMPs: Padrões Moleculares Associados ao Patógeno; PTI: Imunidade Desencadeada pelo PAMP; ETS: Suscetibilidade Desencadeada por Efetores; ETI: Imunidade Desencadeada por Efetor. Fonte: o autor.

3.6. Isolamento e identificação de proteínas apoplásticas

Os estudos biológicos eram realizados somente a partir de análises *in vitro* há alguns anos atrás e os genes e as proteínas eram investigados separadamente. Foi então, que as pesquisas alavancaram em meados dos anos 90 dando início a estudos moleculares em larga escala *in vivo*, como estudos genômicos, transcriptômicos, proteômicos e metabolômicos, as chamadas ômicas, onde a proteômica é fundamental na era pós-genômica com pesquisas aplicadas em qualquer organismo vivo (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; PRATS; JORRÍN-NOVO, 2010). A proteômica possibilita, além de caracterizar proteínas numa amostra, a obter informações sobre processos ou respostas celulares envolvidas em determinado fenômeno ou condição biológica, incluindo a identificação simultânea de um grande número de proteínas e, conseqüentemente de novos genes e vias

metabólicas, as quais são importantes para o entendimento da interação planta-patógeno, por exemplo (GUIMARÃES; RICARDO, 2015).

O termo proteoma foi primeiramente descrito por Marc Wilkins como um “complemento proteico expresso por um genoma” (*PROTein complement expressed by a genOME*) ou por um tipo de célula ou tecido (WILKINS et al., 1996). A técnica proteômica tornou-se muito importante e complexa lidando com o estudo do proteoma celular. Proteoma pode ser definido como sendo o conjunto total de proteínas presentes em uma unidade biológica em um determinado momento, ou seja, sob alguma condição ambiental e em qualquer estágio de desenvolvimento (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; PRATS; JORRÍN-NOVO, 2010).

O’Farrel (1975) foi o primeiro a descrever a separação de proteínas de *Escherichia coli* em gel de poliacrilamida bidimensional. Por meio da focalização, as proteínas foram separadas de acordo com seu ponto isoelétrico e então, submetidas a uma segunda separação, de acordo com a sua massa molecular (O’FARREL, 1975). Um dos primeiros estudos proteômico envolveu a interação planta-patógeno e foi realizado por Pierre De Wit e seu grupo de pesquisa, em 1986, os quais identificaram por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida o produto do gene de avirulência (Avr9) a partir da extração de FA do tomate em interação com o fungo *Cladosporium fulvum* aplicando a técnica de infiltração-centrifugação (De WIT; BUURLAGE; HAMMOND, 1986). Nos últimos 20 anos, técnicas clássicas para extração e resolução de proteínas avançaram e foram inseridas com ferramentas de espectrometria de massa, sequenciamento gênico e bioinformática, aprimorando a pesquisa em biologia molecular. Assim, o estudo do conteúdo proteico da célula abre novas possibilidades para compreender a função dos genes e do genótipo (JORRÍN-NOVO et al., 2018).

A proteômica visa descobrir "como", "onde", "quando" e "por que" são as centenas de milhares de proteínas produzidas em um organismo vivo e como elas interagem entre si e com outras moléculas e com o seu ambiente biótico e abiótico (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, et al., 2010; JORRÍN-NOVO et al., 2018).

As proteínas presentes no apoplasto, como aquelas que são expressas no momento da interação planta-patógeno, apresentam dificuldades em sua obtenção, pois requer evitar a contaminação com compostos citoplasmáticos e a ruptura da parede celular. Sendo assim, ainda são proteínas pouco caracterizadas em

comparação com as intracelulares (DELANOIS et al., 2014). A abordagem proteômica entra como uma ferramenta chave para caracterizar as proteínas presentes no FA e fornece maior entendimento nos processos de percepção e regulação que ocorrem na interação entre planta-patógeno (AGRAWAL et al., 2010; DELANOIS et al., 2014).

Para isolar o FA várias metodologias foram desenvolvidas: perfusão a vácuo em discos de folhas de mamona, girassol e repolho (BERNSTEIN, 1971); aplicação de pressão em folhas de algodão utilizando uma câmara de pressão umidificada (HARTUNG et al., 1987); o método de eluição em ervilha (LONG; WIDDERS, 1990); método de infiltração-centrifugação em folhas de tabaco por Klement, em 1965 (RATHMELL; SEQUEIRA, 1974). Este último tem sido utilizado em alguns trabalhos, como em folhas de *Medicago truncatula* (SOARES et al., 2007), *Nicotiana tabacum* (DELANNOY et al., 2008) e em *Populus deltoides* (PECHANOVA et al., 2010).

A infiltração é realizada a vácuo com uma solução apropriada, por isso o método é também conhecido como VIC (infiltração a vácuo). É importante realizá-lo em boas condições experimentais para evitar acúmulos de interferentes intracelulares e/ou não proteicos, como a força centrífuga baixa que possui contaminação insignificante e o tipo de solução de infiltração que melhore a solubilização das proteínas. Além disso, o correto manuseio e armazenamento pós recuperação do fluido, são procedimentos essenciais e adaptáveis para os diferentes tecidos e espécies de plantas (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2018). Como foi testado por Lohaus et al. em diferentes espécies de planta (*Vicia faba*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Hordeum vulgare*, *Spinacia oleracea*, *Beta vulgaris* e *Zea mays*) e concluído que as condições de infiltração e centrifugação devem ser adaptadas para cada espécie, como o tipo de solução e o tempo utilizado para a infiltração e também a força de centrifugação, para evitar a contaminação citoplasmática (LOHAUS et al., 2001).

Trabalho desenvolvido por Pirovani et al. (2008), avaliou o método VIC em folhas de cacau. Foram utilizadas diferentes forças centrífugas (1.000 g a 4.500 g) para testar o volume do FA coletado, o rendimento proteico e os níveis de contaminação intracelular, onde todos demonstraram aumento linear à medida que a força centrífuga aumentava. Concluíram assim, que a força centrífuga de 3000 g foi ideal, pois, além de ter um bom rendimento possui uma contaminação intracelular

insignificante para folha de cacau. É importante destacar que normalmente muitas proteínas que são secretadas para o espaço extracelular por meio do sistema Retículo Endoplasmático-Golgi, possuem peptídeo sinal (PS). Porém, sabe-se que muitas proteínas não dependem de um PS para ser transportadas na via secretora. Esse transporte é conhecido como secreção proteica não convencional (UPS: *Unconventional Protein Secretion*) (DING et al., 2012). Acredita-se que mais de 50% de proteínas sem PS são secretadas e possivelmente muitas delas que estão relacionadas a defesa/estresse no vegetal, possuem atividade tanto intracelulares quanto extracelulares. Portanto, trabalhos que visam a extração de proteínas do espaço extracelular podem apresentar uma falsa contaminação citoplasmática (AGRAWAL et al., 2010). Diante disto, a extração de FA exige protocolos otimizados e cuidados metodológicos para cada espécie vegetal a ser estudada. Além disso, torna-se muito importante conciliar a técnica da biologia molecular com a bioinformática por meio da predição de localização das proteínas para verificar a credibilidade dos resultados obtidos pós extração.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta das folhas de *T. cacao*

Folhas de *T. cacao* de duas variedades contrastantes para resistência à VB foram utilizadas para coleta: a variedade resistente (CCN-51) e susceptível (Catongo) crescidas em condições de campo (CP), elicítadas pelo fungo *M. pernicioso* e em condições controle, crescidas em casa de vegetação (CV) sob abrigo de chuva. A coleta das folhas dos dois genótipos foi feita no Banco Ativo Germoplasma (BAG) da CEPLAC/CEPEC, onde as plantas foram consideradas elicítadas pelo fungo, devido a presença de vassouras-verde e vassouras-seca. As folhas coletadas não apresentaram sintomas aparentes. Também foram utilizadas plantas sadias crescidas em casa de vegetação no CEPEC/CEPLAC. Após a coleta, as folhas foram mantidas em câmara fria em caixa térmica para evitar a dessecação e diminuir o estresse mantendo suas condições fisiológicas. Logo em seguida, foram submetidas à infiltração para a extração de FA.

4.2. Infiltração e extração do fluido apoplástico das folhas de *T. cacao*

A extração de FA ocorreu de acordo com o protocolo de Pirovani et al. (2008). Para análise proteômica foi utilizado aproximadamente 500 g de folhas maduras de *T. cacao* do genótipo Catongo e 600 g do genótipo CCN-51 e para análise enzimática e bioensaio de germinação foram utilizados cinco folhas para cada repetição. Após a coleta, as folhas foram lavadas com água destilada, as nervuras centrais foram retiradas e com a parte cortada voltada para cima, as folhas foram imersas em um becker contendo fosfato de potássio 10 mM de pH 5,5 ajustado com ácido ascórbico (FA utilizado na análise proteômica) para evitar oxidação ou contendo água (FA utilizado na análise enzimática e no bioensaio de germinação). O becker contendo as folhas foi introduzido em um dessecador e aplicado vácuo de -100 kPa (1 bar) durante 3 minutos, alternando com 2 minutos de pressão atmosférica. Este processo foi realizado até cessar a emissão de bolhas totalizando nove repetições por aproximadamente 27 minutos.

Um suporte coletor do FA foi preparado, onde as partes das folhas foram enroladas ao redor de um anteparo cilíndrico de borracha de 0,8 cm de diâmetro x 9 cm de comprimento e presas com uma fita adesiva e inseridas em um tubo falcon de 15 mL e mantidas em gelo. Em cada tubo falcon, foi encaixado um botão de 20 cm de diâmetro para impedir o deslocamento do anteparo de borracha para o fundo do tubo. Após montados, os tubos foram levados à centrífuga para coleta do FA, onde foi utilizada uma força centrífuga de 3.500 g por 25 minutos, a 4°C. Após a centrifugação o material foi recolhido e mantido no gelo até o uso.

4.3. Extração proteica do fluido apoplástico

A extração de proteínas do FA foi baseada no protocolo descrito por Wang et al. (2003), com as modificações de Pirovani et al. (2008). Alíquotas com um volume de 15 mL de FA foliar de cacau (CCN-51 e Catongo) em CP foi concentrado por liofilização e ressuspenso em 0,8 mL de tampão de extração SDS-Denso (sacarose 30 %, SDS 2 %, Tris-HCL 100 mmol L⁻¹ pH 8,0, 2-mercaptoetanol 5 %). As amostras foram submetidas à sonicação (3 pulsos de 8 s cada, com 10 s de intervalo entre pulsos) com amplitude de 50 % no processador ultrassônico (Gex 130, 130 W) e incubadas no gelo por 10 min. Após, 0,8 mL de fenol saturado, pH 8,0, foi adicionado e mantido por 30 min de incubação sob agitação à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 5.000 g por 10 min a 4 °C. As proteínas da fase fenólica (fase superior) foram extraídas novamente com igual volume de tampão SDS-Denso. As fases fenólicas de duas extrações foram agrupadas e incubadas por 14 h com 5 vezes o volume de acetato de amônio a 100 mmol L⁻¹ em metanol a -20 °C para precipitação das proteínas. Para recuperar as proteínas precipitadas, as amostras foram centrifugadas a 20.000 g por 5 min. a 4 °C. O precipitado proteico foi lavado três vezes com acetato de amônio a 100 mmol L⁻¹ em metanol e duas vezes com acetona. Por fim, o precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 600 µL de tampão de reidratação (ureia 7 mol L⁻¹, tiourea 2 mol L⁻¹, CHAPS 2 % e azul de bromofenol 0,002 %) e estocado a -20 °C até o uso.

As proteínas foram quantificadas pelo método 2D-Quant Kit (GeHealthCare), conforme as recomendações do fabricante, utilizando BSA (soro de albumina bovina) como padrão.

4.4. SDS-PAGE 1D

Após a etapa de quantificação, as proteínas foram resolvidas em eletroforese 1D. Uma massa de 30 µg de proteína do FA de CCN-51 e Catongo (CP), 10 µL de marcador Low Molecular Weight Marker de 14-97 kDa (GE Healthcare) e 30 µg de proteína do extrato total (ET) de folha de CCN-51 (CP) extraídas de acordo com o protocolo desenvolvido por Pirovani et al. (2008), com modificações foram aplicadas em SDS-PAGE em minicubas de eletroforese (Hoefer), com géis de 8 x 10 cm a 12,5 % de acrilamida. Após cerca de 3h de corrida, o gel foi inserido no tampão de fixação (40 % etanol, 10 % ácido acético) durante 1h, corado durante 24 h em Coomassie coloidal G-250 a 0,08 % (NEUHOFF et al., 1988) e, por fim, descorado em água destilada por aproximadamente 2 dias. Após descorado, o gel foi digitalizado usando ImageScanner II (Amersham, GE Healthcare).

4.5. SDS-PAGE 2D

Na separação bidimensional das proteínas foi utilizado 350 µg de proteína de FA dos genótipos CCN-51 e Catongo (CP). Adicionou em solução de reidratação 2-DE contendo Ditiotretol (DTT) com concentração 50 mmol L⁻¹ e 0,5% de anfólito para pH 3-10 Não Linear (NL) (Amersham Biosciences) e o volume final foi ajustado para 250 µL utilizando tampão de reidratação 2-DE. As amostras foram pipetadas em triplicata em suportes (*strip holder*) para tiras de gel (*strips*) de 13 cm com gradiente de pH imobilizado 3-10 NL (Amersham Biosciences, Immobiline™ Dry-Strip). Para evitar desidratação das *strips* foi adicionado cerca de 1 mL de óleo mineral (*Dry Strip Cover Fluid*). Em seguida, as três *strip holder* foram devidamente fechadas e levadas para focalização isoelétrica em *Ettan IPGphor III* (GE Healthcare) onde foram reidratadas por 12 h a 20 °C com as seguintes condições de corrida: 500 V por 1 h, 1000 V por 1: 04 h, 8000 V por 2:30 h e 8000 V por 40 min. Após a focalização, as *strips* foram tratadas com 7 mL de tampão de equilíbrio (ureia 6 mol L⁻¹, SDS 2 %, glicerol 30 %, Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH 8.8 e azul de bromofenol a 0,002 %) contendo 10 mg mL⁻¹ de DTT e mantidas sob agitação leve

por 15 min. Em seguida, esse procedimento foi repetido mais duas vezes, onde as *strips* foram tratadas por 15 min com tampão de equilíbrio contendo 25 mg mL⁻¹ de iodoacetamida e lavadas por 15 min com tampão de corrida (Tris 25 mmol L⁻¹ pH 8.3, glicina 0,19 mol L⁻¹, SDS 0,1 %).

Após tratadas, as *strips* foram submetidas à segunda dimensão. Elas foram dispostas na parte superior de gel de poliacrilamida a 12,5 %. Ao lado de cada *strip* foi inserido um pedaço de papel filtro contendo o marcador de peso molecular Low Molecular Weight Marker de 14-97 kDa (GE Healthcare) e selado com 1 % de agarose (TRIS Base a 25 mmol L⁻¹, glicina a 192 mmol L⁻¹, SDS a 0,1 %, agarose a 0,5 % e *bromophenol blue* a 0,002 %). Para a corrida eletroforética foram aplicadas as seguintes condições: 15 mA/gel por 15 min, 40 mA/gel por 30 min e 50 mA/gel por 4 h.

Após a corrida eletroforética, os géis foram transferidos para o tampão de fixação (40 % etanol, 10 % ácido acético) durante 1 h. Em seguida, os géis foram corados em Coomassie coloidal (sulfato de amônio 8 %, ácido fosfórico 0.8 %, azul de coomassie G-250 0.08 % e metanol 20 %) (NEUHOFF et al., 1988). Após 7 dias corando sob agitação suave, os géis foram descorados, por aproximadamente o mesmo período, com sucessivas lavagens utilizando água destilada autoclavada e foram mantidos em ácido acético a 7 % até o uso. Os géis foram feitos em triplicatas para os dois genótipos.

4.6. Análise dos géis

Os géis foram digitalizados pelo *LabScanner* (Amersham Bioscience) e analisados no software *Image Master 2D Platinum 7.0* (GE healthcare), onde foram detectados a quantidade dos *spots*, bem como a massa molecular e ponto isoelétrico de cada um. Um *match* entre os géis de cada genótipo foi realizado e enumerado todos os *spots* detectados para posterior excisão.

4.7. Excisão dos *spots*, extração dos peptídeos e identificação por espectrometria de massas (MS/MS)

Para obter o mapa proteômico do FA de cacau, todos os *spots* detectados de cada genótipo foram excisados de uma das triplicatas do gel 2-D com auxílio de um bisturi e utilizados na digestão trípica. Os pedaços de géis foram inseridos em tubos de Eppendorf (1,5 µL) e adicionado 200 µL de NH_4HCO_3 a 25 mmol L⁻¹, contendo acetonitrila 50% pH 8, por 24 h para descorar o gel. O sobrenadante foi descartado e seguiu com uma lavagem dos fragmentos dos géis com 200 µL de água Milli-Q. O sobrenadante foi novamente descartado seguindo da desidratação do gel por meio da adição de 100 µL de acetonitrila a 100 % por 5 min em temperatura ambiente e levados para o secador centrífugo (*Speed Vac*; Eppendorf) por, aproximadamente 20 min ou até completa secagem dos géis. Em seguida, os fragmentos dos géis foram reidratados com a adição de 4 µL de tripsina Gold (Promega) a 25 ng µL⁻¹ e incubados por 10 min a 4° C. Uma solução de NH_4HCO_3 a 25 mmol L⁻¹ foi adicionado até cobrir os fragmentos e incubados novamente, por 16 h à 37° C para a ação da tripsina. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para novos tubos de Eppendorf e realizado duas lavagens com 50 µL de acetonitrila a 50% contendo ácido fórmico a 5 %, sob agitação em vortex durante 30 min. Os sobrenadantes referentes às duas lavagens foram reunidos aos novos tubos. Por fim, as amostras foram concentradas atingindo um volume de 15 a 20 µL em secador centrífugo (*Speed Vac*; Eppendorf). As amostras foram pipetadas em “Vials” (Waters) e analisadas em um cromatógrafo nanoAcquity (Waters, Milford, MA) acoplado ao espectrômetro de massas Q-ToF micro (Waters) para a identificação dos peptídeos (VILELA-DIAS et al., 2014)

4.8. Busca da identidade das proteínas no banco de dados

Os espectros gerados foram analisados por meio do *software ProteinLynx* Global Server 4.2 (WATERS) e comparados com os bancos NCBI e SwissProt por meio do servidor *MASCOT MS/MS Ion Search* (www.matrixscience.com) seguindo as configurações: digestão trípica, com 1 sítio de clivagem perdida, carbamidometilação de cisteínas (Cys) como modificação fixa e oxidação de metionina (Met) como modificação variável, erro tolerante de 30 ppm e tolerância para erro de massa igual a 0,3 Da e para erro dos íons fragmentados de 0,1 Da.

4.9. Anotação da função, predição do peptídeo sinal e localização subcelular das proteínas

Após obter as sequências FASTA, o *software* BLAST2GO (www.blast2go.com) foi usado para análise e anotação funcional das proteínas e, posteriormente, para separar por categorias de acordo com a função e processos celulares. As sequências FASTA também foram submetidas à predição de peptídeo de sinal pelo servidor SignalP 4.1 Sever (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) (BENDTSEN et al., 2004), ao servidor DeepLoc-1.0 (www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/) que prevê a localização subcelular de proteínas eucarióticas e ao ApoplastP (www.apoplastp.csiro.au/) que prevê se a proteína se localiza no apoplasto.

4.10. Metabolismo antioxidativo

Para avaliação do metabolismo oxidativo, o FA foi coletado por infiltração em água destilada gelada. Para coleta do FA foram utilizadas folhas de cacau dos genótipos CCN-51 e Catongo CP e CV. Para cada amostra foram feitas três repetições biológicas (totalizando 12 amostras). Em cada repetição foram utilizadas 10 partes das folhas de cacau (um total de 5 folhas inteiras).

4.10.1. Atividade de Peroxidase do Guaiacol (GPX; EC: 1.11.1.7)

A atividade de GPX foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rehem et al. (2011), com modificações. Um volume de 140 μL do mix de reação foi pipetado (139 μL de tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 6,0 e 1 μL do FA). Em seguida, foi pipetado 140 μL de tampão de reação (fosfato de sódio a 20 mmol L^{-1} , pH 6,0 + guaiacol a 40 mmol L^{-1} + peróxido de hidrogênio a 0,06 %). As leituras de absorbância foram feitas em quadruplicatas em placa especial com filtro UV em um espectrofotômetro de microplacas SpectraMax Paradigm (Molecular Devices), utilizando o comprimento de onda de 470 nm a 25 $^{\circ}\text{C}$, durante 3 min com leituras a cada 20 s. O consumo de guaiacol, em $\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$, foi calculado com o uso da

equação $y = 0,01890 + 1284x$, originada a partir de uma curva padrão para POD-guaiacol.

4.10.2. Atividade de Peroxidase do Ascorbato (APX; EC:1.11.1.11)

A atividade de APX foi realizada como descrito por Nakano e Asada (1981), com modificações. Um volume de 180 μL do mix de reação foi pipetado (fosfato de potássio a 50 mmol L^{-1} , pH 7 + ácido ascórbico a 0,5 mmol L^{-1} + EDTA a 0,1 mmol L^{-1} + amostra) mais 20 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 300 mmol L^{-1} . As leituras de absorbância foram feitas em quadruplicatas em placa especial com filtro UV em um espectrofotômetro de microplacas SpectraMax Paradigm (Molecular Devices), utilizando o comprimento de onda de 290 nm durante 5 min, com leituras a cada 30 s, a 30 °C. Na reação, a presença da APX no FA (40 μL) reduz a concentração de H_2O_2 do meio, devido a redução do ascorbato adicionado. Os valores foram expressos em $\text{mmol de H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$.

4.11. Bioensaio de germinação dos basidiósporos de *M. pernicios* na presença do FA

Para a avaliação da germinação dos basidiósporos de *M. pernicios*, o FA utilizado foi o mesmo da avaliação do metabolismo oxidativo descrito acima. Um volume de 360 μL do FA (tratamento) ou água (amostra controle) foi reunido em 80 μL de suspensão de 1×10^5 basidiósporos mL^{-1} de *M. pernicios* e incubados a 25 °C por 30 min. As soluções foram distribuídas em 3 pontos em lâminas de microscópio contendo 12 % de meio ágar-ágar e incubadas novamente em placas de Petri a 25 °C. Para cada amostra foram feitas 2 lâminas. Após 4 h de incubação, a germinação foi interrompida incubando as amostras a -20 °C. As porcentagens de inibição foram calculadas tendo como referência os basidiósporos germinados em água da amostra controle.

5. RESULTADOS

5.1. Extração e rendimento de fluido apoplástico para análise proteômica

O protocolo otimizado por Pirovani et al. (2008) foi eficiente na obtenção do rendimento proteico para análise proteômica, sendo suficiente para as triplicatas de géis, onde obteve $4,55 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ e $4,087 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de proteína, para o genótipo Catongo e CCN-51, respectivamente.

5.2. Perfil proteico do fluido apoplástico resolvidos em 1D e 2D-SDS-PAGE

As proteínas do FA foram resolvidas juntamente com proteínas de extrato total de folha de cacau (ET) em SDS-PAGE a 12,5% (Figura 3) e revelaram bandas definidas distribuídas entre a faixa de 14.4 e 97 kDa. Uma banda bem definida (seta preta) é mostrada no ET da folha e em menor intensidade (quase ausente) nas amostras de FA (colunas 2 e 3). Além disso, ocorrem bandas características de amostra de FA e ausentes em ET com aproximadamente 35 kDa (setas vermelhas).

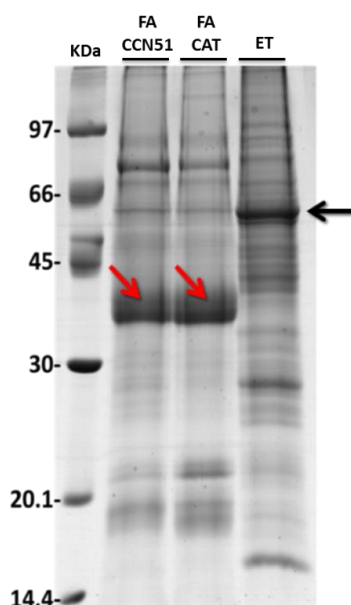


Figura 3. Perfil proteico do fluido apoplástico de genótipos de cacau elicitados pelo fungo *M. pernicioso* em SDS PAGE. kDa: Marcador de Peso Molecular; FA CCN51: FA do genótipo CCN-51; FA Cat: FA do genótipo Catongo; ET: proteínas do extrato total de folha de cacau. As setas vermelhas e preta mostram proteínas características do fluido apoplástico e do extrato total de folhas, respectivamente.

O perfil proteico do FA dos genótipos CCN-51 e Catongo foram então resolvidos em géis 2-D de poliacrilamida a 12,5%. Apesar de ocorrer alguns arrastes principalmente horizontal, foi possível detectar 138 *spots* no gel de CCN-51 e 62 *spots* no gel do Catongo (Figura 4).

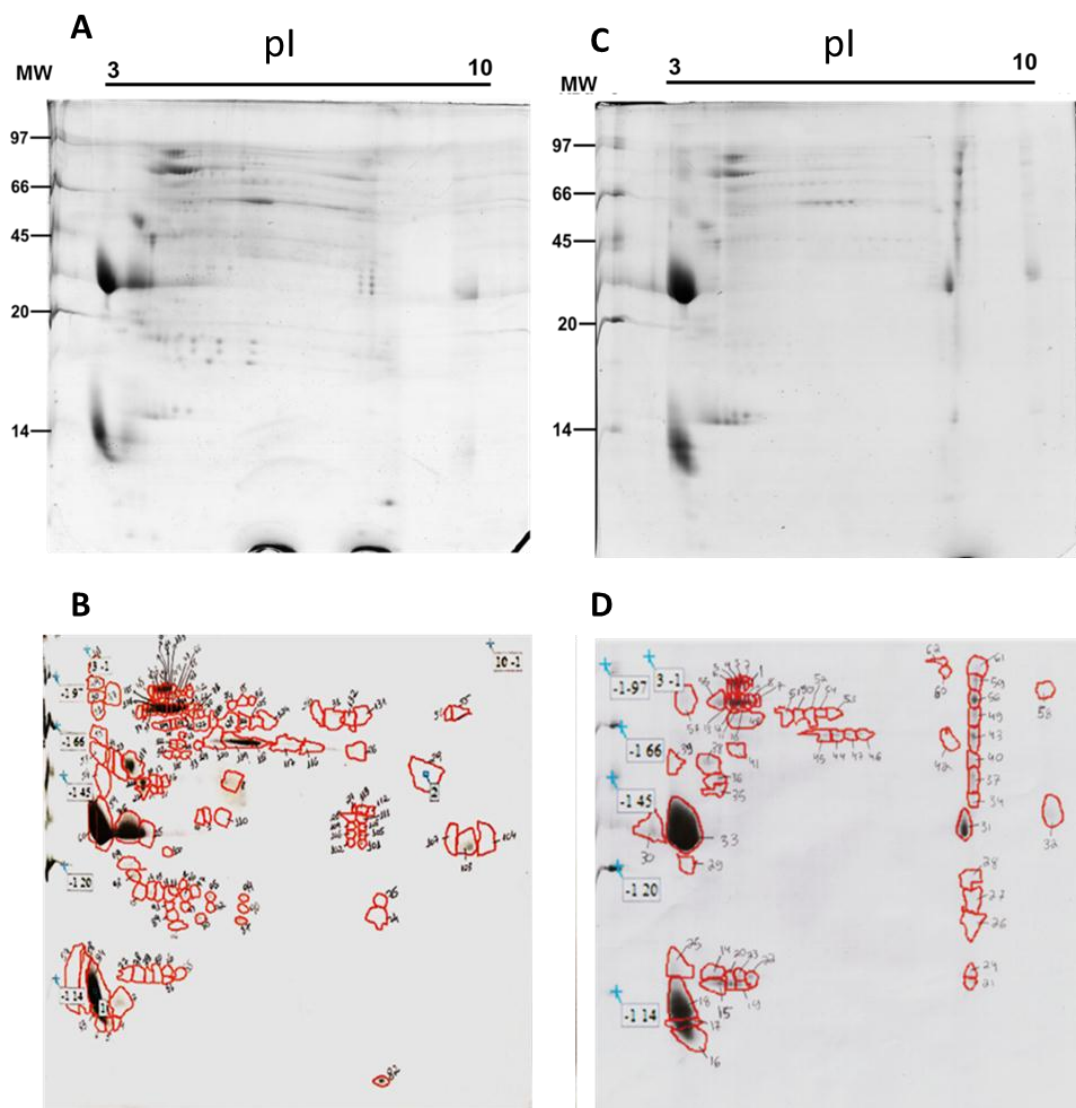


Figura 4. Perfil proteico bidimensional do fluido apoplástico de genótipos de *T. cacao*. A: CCN-51. B: *Spots* detectados do genótipo CCN-51. C: Catongo. D: *Spots* detectados do genótipo Catongo. As amostras foram focalizadas em *strips* de 13 cm e pH 3-10 NL (não linear). Separadas na segunda dimensão em gel de poliacrilamida 12,5 % e coradas com azul comassie coloidal (NEUHOFF et al., 1988). MW indica o valor massa molecular em kDa. pI indica o gradiente de ponto isoelétrico ao longo do gel.

5.3. Avaliação da distribuição dos *spots* proteicos no gel 2-D quanto a Massa Molecular (MW) e Ponto Isoelétrico (pI)

A distribuição dos *spots* foi avaliada de acordo com a massa molecular (MW) e o ponto isoelétrico (pI) para os dois genótipos de cacau. Para a MW a maioria dos *spots* detectados no gel foi visualizada na faixa menor que 30 kDa, para o genótipo CCN-51 e na faixa acima de 66 kDa, para o genótipo Catongo (Figura 5). Quanto ao pI, a maioria dos *spots* detectados no gel foi visualizada entre os valores de pH de 4 a 5 em ambas as amostras (Figura 6).

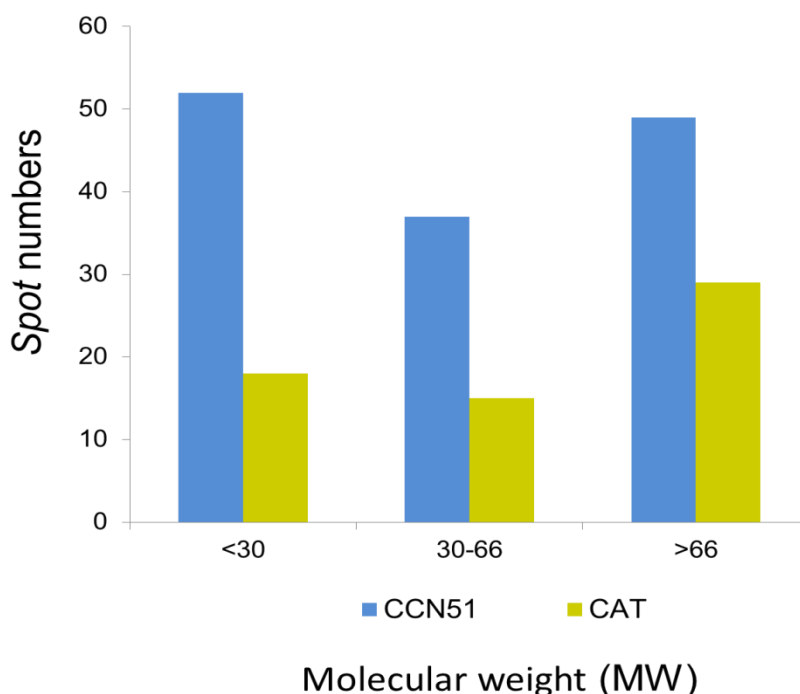


Figura 5. Distribuição dos *spots* proteicos resultantes de fluido apoplástico de CCN-51 e Catongo, detectados no mapa 2D, de acordo com a peso molecular (MW).

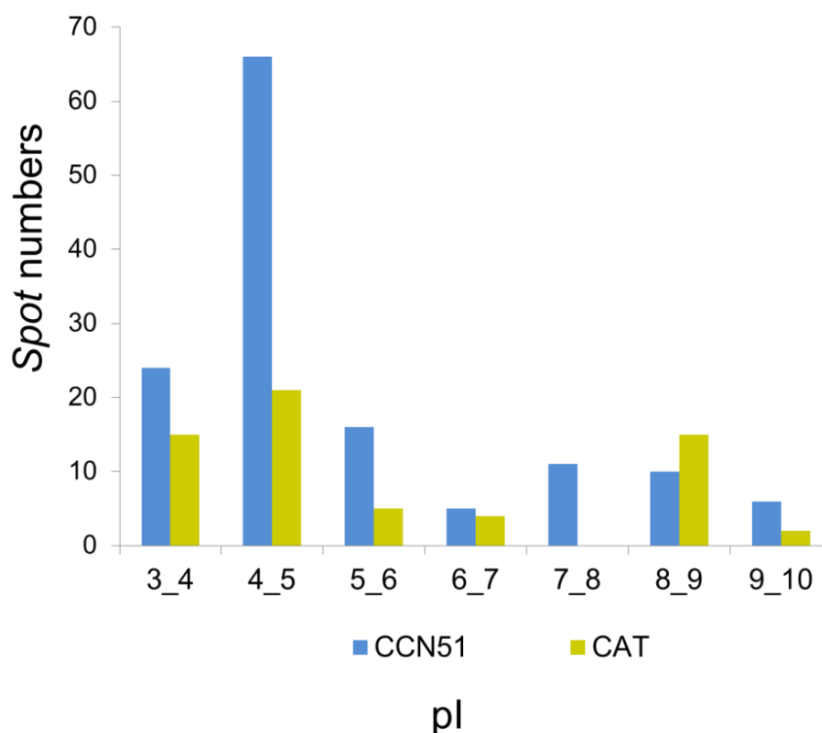


Figura 6. Distribuição dos *spots* proteicos resultantes de fluido apoplástico de CCN-51 e Catongo, detectados no mapa 2D, de acordo com o ponto isoelétrico (pI) (3-10 NL).

5.4. Identificação das proteínas

As triplicatas dos géis dos dois genótipos foram analisadas pelo programa *Image Master 7.0*, onde foram identificados os *spots* e feitas algumas alterações manuais. Todos os *spots* detectados foram excisados e submetidos à espectrometria de massas. Dentre os 138 *spots* do genótipo CCN-51, foram identificadas 86 proteínas e dentre os 62 *spots* do genótipo Catongo, foram identificadas 31 proteínas. Este cálculo inclui o número de repetições das mesmas proteínas, pois várias isoformas de proteínas foram encontradas. Duas listas foram geradas, uma para cada genótipo (Tabela 1 e 2). As proteínas listadas apresentaram identidade com sequências proteicas encontradas no banco de dados do NCBI, por meio da ferramenta *Mascot* (www.matrixscience.com). Algumas proteínas foram identificadas pelo programa *ProteinLynx*, as quais também foram comparadas com

sequências de proteínas no banco de dados do NCBI. Proteínas que apresentaram baixa probabilidade (<30%) foram desconsideradas.

Tabela 1. Proteínas do fluido apoplástico identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) do genótipo CCN-51 de *T. cacao*, em condições de campo.

Spot	Accession	Specie	Protein ID	Sequence Coverage	Mowse Score	Theoretical MM (Da)/ PI	Number of matched peptides
01*	Tc06v2_p009050.1	<i>Theobroma cacao</i>	Cysteine-rich repeat secretory protein 38	24.3802%	93.95%	26720/ 6.1225	6
02*	EOY24665.1	<i>Theobroma cacao</i>	<i>Osmotin 34 OS</i>	60.2679%	97.99%	24128/ 6.7009	13
04	1::EOY11059.1	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis-related protein P2	4%	75	30647/ 4.15	1
05*	A0A061F976_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis related protein P2 OS	18.4116%	100%	29906/ 3.9551	3
06	<u>1::EOY11059.1</u>	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis-related protein P2	4%	99	30647/ 4.15	1
07	<u>1::EOY11059.1</u>	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis-related protein P2	30%	277	30647/ 4.15	4
10	<u>1::EOY11059.1</u>	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis-related protein P2	22%	144	30647/ 4.15	6
11*	A0A061DGD0_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Basic chitinase OS	30.038%	100%	28811/ 5.8777	5
12*	A0A061GBZ8_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Receptor like protein kinase related family protein	50	99.83%	26720/ 6.1225	11
13*	A0A061GBZ8_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Receptor like protein kinase related family protein	56.6116	99.18%	26720/ 6.1225	14
16*	A0A061F4R2_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Peroxidase OS GN TCM 024936	12, 9909	100	34946/ 4,7834	3
17	<u>1::EOY09519.1</u>	<i>Theobroma cacao</i>	Peroxidase 2	3%	68	35402/ 4.97	1
18*	A0A061F4R2_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Peroxidase OS GN TCM 024936 PE 3 SV 1	12,9909	100	34946/ 4,7834	3

19*	A0A061F4R2_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Peroxidase OS GN TCM 024936 PE 3 SV 1	8,4592	100	34946/ 4,7834	3
20	<u>1::EOY09519.1</u>	<i>Theobroma cacao</i>	Peroxidase 2	3%	69	35402/ 4.97	1
21*	A0A061F4R2_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Peroxidase OS T GN TCM 024936 PE 3 SV 1	23,2628	100	34946/ 4,7834	5
22	<u>1::EOY09519.1</u>	<i>Theobroma cacao</i>	Peroxidase 2	10%	197	35402/ 4.97	4
25	<u>1::EOY11059.1</u>	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis-related protein P2	38%	725	30647/ 4.15	33
26*	A0A061FWE6_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Uncharacterized protein OS GN TCM 013457 PE 4 SV 1	13,7363	7,69	21481/ 9,4471	2
27	<u>1::1SCH_A</u>	<i>Arachis hypogaea</i>	Chain A, Peanut Peroxidase, Major Cationic Isozyme	5%	57	31616/ 8.06	1
28	<u>1::1SCH_A</u>	<i>Arachis hypogaea</i>	Chain A, Peanut Peroxidase, Major Cationic Isozyme	5%	57	31616/ 8.06	1
30	<u>1::EOY15095.1</u>	<i>Theobroma cacao</i>	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein isoform 1	1%	47	78395/ 5.24	1
31*	A0A061E984_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Encodes a protein whose expression is responsive to nematode infection putative OS	7,489	44,54	25392/ 10,2433	3
33*	A0A061FDH3_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Subtilisin like serine endopeptidase family protein isoform 2 OS GN TCM 034269 PE 4	18,134	50,74	80867/ 4,9807	11
35*	A0A061DLG7_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Uncharacterized protein OS GN TCM 002110 PE 4 SV 1	11,4667	52,49	42101/ 5,3372	3
37	1::EOY15095.1	<i>Theobroma cacao</i>	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein isoform 1	2%	47	78395/ 5.24	1
38	1::EOY15095.1	<i>Theobroma cacao</i>	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein isoform 1	2%	51	78395/ 5.24	1

40*	A0A061FMR3_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	AGAMOUS like 104 OS GN TCM 034757 PE 4 SV 1	10,8108	100	37570/ 5,3068	2
44	1::EOY14420.1	<i>Theobroma cacao</i>	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein	1%	61	82145/ 5.34	1
45*	A0A061FK23_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Laccase OS GN TCM 036604 PE 3 SV 1	6,962	44,65	52535/ 6,043	2
46*	A0A061FK23_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Laccase OS GN TCM 036604 PE 3 SV 1	8,4388	38,9	52535/ 6,043	3
49*	A0A061EN01_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Bifunctional inhibitor/ lipid transfer protein/ seed storage 2S albumin superfamily protein putative	3,7037	45,6	22103/ 8,2154	2
53*	A0A061F976_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis related protein P2 OS GN TCM 026330 PE 4 SV 1	46,5704	100	29906/ 3,9551	9
54*	A0A061F976_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis related protein P2 OS GN TCM 026330 PE 4 SV 1	46,5704	100	29906/ 3,9551	9
56*	A0A061FDH3_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Subtilisin like serine endopeptidase family protein isoform 2 OS GN TCM 034269 PE 4	16,1629	50,3	80867/ 4,9807	9
57*	A0A061F976_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis related protein P2 OS GN TCM 026330 PE 4 SV 1	16,9675	100	29906/ 3,9551	4
58	1::EOY11059.1	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis-related protein P2	38%	982	30647/ 4.15	33
59	1::EOY11059.1	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis-related protein P2	38%	1883	30647/ 4.15	54
60	1::EOY11059.1	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis-related protein P2	7%	76	30647/ 4.15	1
61*	E3VTX3_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	ATP synthase subunit alpha OS GN atpA PE 3 SV 1	22,5296	38,39	55278/ 5,0035	8
62*	A0A061FMR3_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	AGAMOUS like 104 OS GN TCM 034757 PE 4 SV 1	12,9129	99,67	37570/ 5,3068	3
63	1::EOY15095.1	<i>Theobroma cacao</i>	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein isoform 1	5%	51	78395/ 5.24	2
64	1::EOY15095.1	<i>Theobroma cacao</i>	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein isoform 1	15%	205	78395/ 5.24	6
67	1::EOY15095.1	<i>Theobroma cacao</i>	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein isoform 1	3%	120	78395/ 5.24	2

68*	A0A061FK23_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Laccase OS GN TCM 036604 PE 3 SV 1	4,8523	43	52535/ 6,043	2
70*	A0A061E0C6_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Leucine rich repeat family protein OS GN TCM 007197 PE 4 SV 1	2,1472	98,87	36347/ 8,5829	1
73	<u>1::EOY15095.1</u>	<i>Theobroma cacao</i>	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein isoform 1	7%	63	78395/ 5.24	4
76	<u>1::EOY11059.1</u>	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis-related protein P2	38%	1883	30647/ 4.15	53
77	<u>1::EOY21247.1</u>	<i>Theobroma cacao</i>	21 kDa seed protein	27%	134	24264/ 5.94	5
78	1::EOY21247.1	<i>Theobroma cacao</i>	21 kDa seed protein	14%	162	24264/ 5.71	2
80	Q8S4Z5_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Trypsin inhibitor Fragment	14.2857	41.15	16572/ 4.3381	3
81	Q8S4Z5_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Trypsin inhibitor Fragment	22.7273	41.15	4.3381/ 16572	3
82	A0A061EGU5_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Ribulose biphosphate carboxylase small chain OS	41.7989	49.99	21361/ 9.3252	8
83	<u>1::EOY11059.1</u>	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis-related protein P2	22%	85	30647/ 4.15	5
84	<u>1::EOY11059.1</u>	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis-related protein P2	38%	543	30647/ 4.15	22
85*	A0A061FWL5_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	21 kDa seed protein OS GN TCM 012662 PE 4 SV 1	53,4247	49,92	23921/ 5,6581	11
86*	Q8S4Z5_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Trypsin inhibitor Fragment OS PE 4 SV 1	14,2857	41,16	16572/ 4,3381	2
87*	EOY24665.1	<i>Theobroma cacao</i>	Osmotin 34 OS GN TCM 016208 PE 4 SV 1	61,1607	100	24128/ 6,7009	14
88*	EOY24665.1	<i>Theobroma cacao</i>	Osmotin 34 OS	61.1607	100	24128/ 6.7009	15
90*	A0A061GBZ8_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Receptor like protein kinase related family protein	55.7851	100	26720/ 6,1225	12
92*	A0A061GBZ8_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Receptor like protein kinase related family protein	45.0413	100	26720/ 6,1225	12
93*	A0A061GBZ8_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Receptor like protein kinase related family protein OS GN TCM 029030 PE 4 SV 1	25,6198	100	26720/ 6,1225	6
94*	A0A061GBZ8_THECC	<i>Theobroma</i>	Receptor like protein kinase related family	29,3388	99,88	26720/	7

		<i>cacao</i>	protein OS GN TCM 029030 PE 4 SV 1			6,1225	
95*	A0A061GBZ8_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Receptor like protein kinase related family protein OS GN TCM 029030 PE 4 SV 1	25,6198	100	26720/6,1225	7
96*	A0A061GBZ8_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Receptor like protein kinase related family protein OS GN TCM 029030 PE 4 SV 1	25,6198	100	26720/6,1225	7
98*	A0A061GD33_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Chlorophyll a b binding protein chloroplastic	6.8182	37.01	28095/4,9611	2
99*	A0A061EK23_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Carrot EP3 3 chitinase	31.7343	100	28771/4,7952	6
100*	A0A061DG44_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Photosystem II subunit O 2 OS GN TCM 000498 PE 4 SV 1	38,253	83,09	35135/5,6759	9
101*	A0A061EHM5_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Peroxidase OS GN TCM 019761 PE 3 SV 1	34,1615	100	34245/8,6561	9
103*	A0A061F976_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis related protein P2 OS	32.13	100%	29906/3,9551	6
104*	A0A061F976_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis related protein P2 OS GN TCM 026330 PE 4 SV 1	41.5162	100	29906/3,9551	8
105*	A0A061EHM5_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Peroxidase OS GN TCM 019761 PE 3 SV 1	29,5031093	100	34245/8,6561	9
106*	A0A061EHM5_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Peroxidase OS GN TCM 019761 PE 3 SV 1	38,5093	100	34245/8,6561	10
107*	A0A061F976_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis related protein P2 OS GN TCM 026330 PE 4 SV 1	41.5162	100	29906/3,9551	8
108*	A0A061EHM5_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Peroxidase OS GN TCM 019761 PE 3 SV 1	29,5031	100	34245/8,6561	8
110*	A0A061EHM5_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Peroxidase OS GN TCM 019761 PE 3 SV 1	13.0056	100	137258/5,1912	12
113*	A0A061GZ32_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Uncharacterized protein OS GN TCM 042204 PE 4 SV 1	7,4074	35,7	9353/11,7903	1
114*	A0A061GSL9_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Peroxidase OS	45.6647	100	37145/4,4257	11
119*	O19869_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Ribulose biphosphate carboxylase large chain Fragment OS GN rbcL PE 3 SV 1	21,8487	37,66	52840/5,9299	12
120*	O19869_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Ribulose biphosphate carboxylase large chain Fragment OS GN rbcL PE 3 SV 1	26,2605	36,67	52840/5,9299	14

121*	A0A061DI85_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Cellulase protein isoform 1 OS GN TCM 001160 PE 3 SV 1	39,3574	94,9	55834/5,0076	15
123*	E3VTZ4_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	ATP synthase subunit beta OS GN atpB PE 3 SV 1	37,9518	32,49	53636/5,1112	16
124*	A0A061E0K1_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	F22L4 1 protein putative isoform 1 OS	6.8017	19.97	79868/9.0031	5
127*	A0A061EN01_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Non-specific lipid-transfer protein-like protein At2g13820	3.7037	34.47	8.2154/22103	1
133*	A0A061FCN5_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Subtilisin like serine endopeptidase family protein isoform 1	39.8639	100	77824/5.0876	23
134*	A0A061FCN5_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	Subtilisin like serine endopeptidase family protein isoform 1	35.6463	100	77824/5.0876	22

*Proteínas identificadas no banco de dados do Proteinlynx; MM corresponde aos valores de massa molecular (Da) e pI ao ponto isoelétrico; Mowse Score corresponde ao valor da cobertura calculado pelo Mascot.

Tabela 2. Proteínas do fluido apoplástico identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) do genótipo Catongo de *T. cacao*, em condições de campo.

Spot	Accession	Specie	Protein ID	Sequence Coverage	Mowse Score	Theoretical MM (Da)/ pI	Number of matched peptides
3*	XP_022766281.1	<i>Durio zibethinus</i>	Laccase- 14-like	4,8523	41,6%	52535/ 6,043	2
4*	A0A061FK23_THEC C	<i>Theobroma cacao</i>	Laccase OS GN TCM 036604 PE 3 SV 1	4,8523	41,94	52535/ 6,043	2
9*	A0A061FDH3_THEC C	<i>Theobroma cacao</i>	Subtilisin like serine endopeptidase family protein isoform 2 OS GN TCM 034269 PE 4	12,2208	50,74	80867/ 4,9807	7
10*	A0A061FDH3_THEC C	<i>Theobroma cacao</i>	Subtilisin like serine endopeptidase family protein isoform 2 OS GN TCM 034269 PE 4	15,5059	50,64	80867/ 4,9807	7
12*	A0A061FDH3_THEC C	<i>Theobroma cacao</i>	Subtilisin like serine endopeptidase family protein isoform 2 OS GN TCM 034269 PE 4	15,5059	50,64	80867/ 4,9807	8
13*	A0A061FCN5_THEC C	<i>Theobroma cacao</i>	Subtilisin like serine endopeptidase family protein isoform 1 OS GN TCM 034269 PE 4	20,1361	100	77824/ 5,0876	11
14	1::EOY21247.1	<i>Theobroma cacao</i>	21 kDa seed protein	5%	85	24264/ 5.71	1
15	<u>1::EOY21247.1</u>	<i>Theobroma cacao</i>	21 kDa seed protein	10%	70	24264/ 5.71	1
16	XP_017977068.1	<i>Theobroma cacao</i>	PREDICTED: pathogenesis-related protein PR-4A	4%	119	30647/ 4.15	1
17*	A0A061F976_THEC C	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis related protein P2	38.9892	100	29906/ 3.9551	5
18*	A0A061F976_THEC C	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis related protein P2	33.574	100	29906/ 3.9551	5
19	1::EOY21247.1	<i>Theobroma cacao</i>	21 kDa seed protein	5%	85	24264/ 5.71	1
20	<u>1::EOY21247.1</u>	<i>Theobroma cacao</i>	21 kDa seed protein	15%	138	24264/ 5.71	2
22	2::ASP_THECC	<i>Theobroma cacao</i>	21 kDa seed protein	5%	68	24423/ 5.70	1
23*	A0A061FVK5_THEC C	<i>Theobroma cacao</i>	21 kDa seed protein OS GN TCM 012673 PE 4 SV 1	29,2237	50,8	23920/ 5,9246	7

24*	A0A061GQS6_THEC	<i>Theobroma cacao</i>	Uncharacterized protein OS GN TCM 038860 PE 4 SV 1	12,5	100	10510/6,2053	1
25	<u>1::EOY11059.1</u>	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis-related protein P2	29%	311	30647/ 4.15	13
29*	<u>1::EOY11059.1</u>	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis related protein P2 OS GN TCM 026330 PE 4 SV 1	15,5235	30,26	29906/3,9551	3
30	<u>1::EOY11059.1</u>	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis-related protein P2	4%	100	30647/ 4.15	1
32*	A0A061E838_THEC	<i>Theobroma cacao</i>	Ribosomal protein S27a Ubiquitin family protein	12,8205	53,27	17690/10,1931	1
33	<u>1::EOY11059.1</u>	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis-related protein P2	38%	4083	30647/ 4.15	88
34*	A0A061E0K1_THEC	<i>Theobroma cacao</i>	F22L4 1 protein putative isoform 1 OS GN TCM 005196 PE 4 SV 1	4,3415	95,87	79868/9,0031	3
35*	A0A061F4R2_THEC	<i>Theobroma cacao</i>	Peroxidase OS GN TCM 024936 PE 3 SV 1	3,6254	99,34	34946/4,7834	1
36*	A0A061F4R2_THEC	<i>Theobroma cacao</i>	Peroxidase OS GN TCM 024936 PE 3 SV 1	8,4592	100	34946/4,7834	3
37*	A0A061GSL9_THEC	<i>Theobroma cacao</i>	Peroxidase OS GN TCM 040312 PE 3 SV 1	11,2717	87,54	37145/4,4257	4
38	1::EOY32408.1	<i>Theobroma cacao</i>	Peroxidase superfamily protein, putative	6%	66	37772/ 4.62	1
39*	A0A061GSL9_THEC	<i>Theobroma cacao</i>	Peroxidase OS GN TCM 040312 PE 3 SV 1	3,4682	81,3	37145/4,4257	1
55	1::EOY15095.1	<i>Theobroma cacao</i>	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein isoform 1	2%	75	78395 / 5.24	1
56*	A0A061FCN5_THEC	<i>Theobroma cacao</i>	Subtilisin like serine endopeptidase family protein isoform 1 OS GN TCM 034269 PE 4	14,8299	89,08	77824/5,0876	10
57	1::EOY11059.1	<i>Theobroma cacao</i>	Pathogenesis-related protein P2	4%	93	30647/4.15	1
59*	A0A061FJB8_THEC	<i>Theobroma cacao</i>	Laccase OS GN TCM 036608 PE 3 SV 1	3,3403	31,1	52862/4,5769	1

*Proteínas identificadas no banco de dados do Proteinlynx; MM corresponde aos valores de massa molecular (Da) e pI ao ponto isoelétrico; Score corresponde ao valor da cobertura calculado pelo Mascot.

5.5. Classificação funcional das proteínas de fluido apoplástico de *T. cacao*

As proteínas identificadas foram submetidas à classificação funcional pelo *software Blast2GO*, de acordo com suas funções e seu envolvimento em processos biológicos, por meio de análises do *Gene Ontology*. A maior parte das proteínas identificadas de ambos os genótipos está relacionada à resposta de defesa e estresse, para o genótipo CCN-51, 81 % das proteínas e para o genótipo Catongo, 67 %. Outras categorias foram atribuídas na classificação funcional, onde proteínas do genótipo CCN-51 estão envolvidas nos processos metabólicos (7 %) e processos de oxirredução (4 %) (Figura 7). Para o genótipo Catongo, 10 % das proteínas estão relacionadas com o processo de oxirredução (Figura 8). Não foi detectada nenhuma proteína relacionada a processos metabólicos, como processos fotossintetizantes em Catongo.

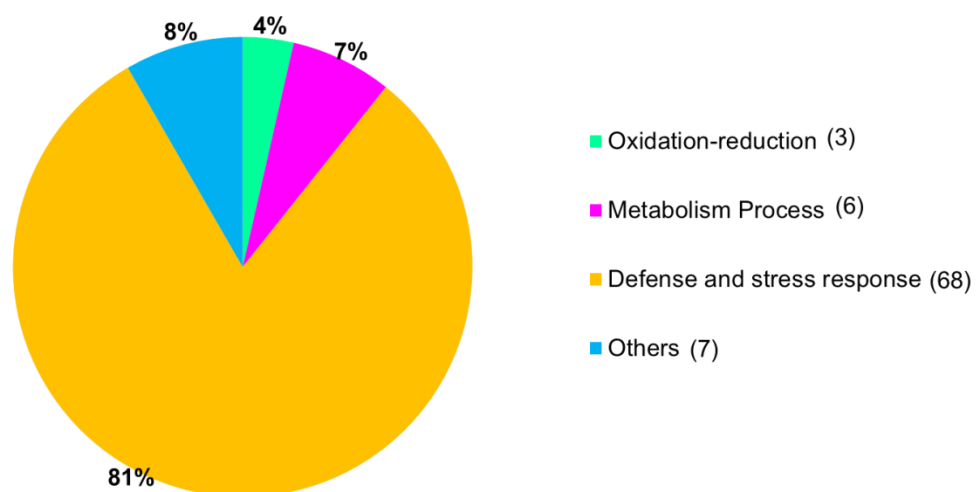


Figura 7. Caracterização por processos biológicos das proteínas identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) no apoplasto do genótipo de *T. cacao* CCN-51, em condições de campo.

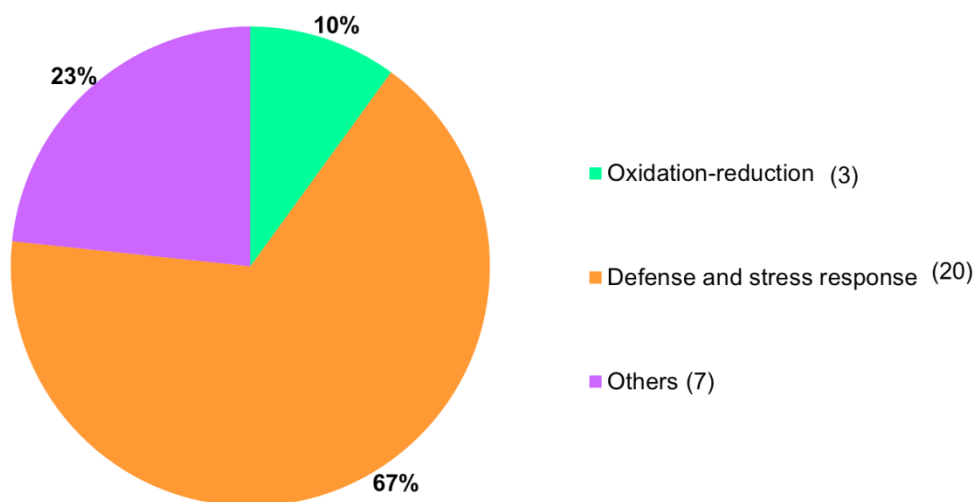


Figura 8. Caracterização por processos biológicos das proteínas identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) no apoplasto do genótipo de *T. cacao* Catongo, em condições de campo

5.6. Predição de localização celular das proteínas de fluido apoplástico de *T. cacao*

As sequências FASTA foram submetidas a um conjunto de três programas específicos para predição de localização subcelular de proteínas (SignalP4.1, DeepLoc-1.0, ApoplastP). As tabelas 3 e 4 mostram os resultados previstos.

O genótipo CCN-51 apresentou 67 proteínas preditas para o apoplasto por pelo menos um dos programas utilizados (78% das proteínas totais identificadas). O genótipo Catongo apresentou 22 proteínas preditas para o apoplasto por pelo menos um dos programas (71% das proteínas totais identificadas).

Tabela 3. Predição de localização celular das proteínas de fluido apoplástico do genótipo CCN-51 de *T. cacao*.

Nº SPOT	Nome da proteína	SignalP	DeepLoc	ApoplastP
01	PREDICTED: cysteine-rich repeat secretory protein 38	Sim	Apoplasto	Apoplasto
02, 87, 88	Osmotin 34	Sim	Apoplasto	Apoplasto
04, 05, 06, 07, 10, 25, 53, 54, 57, 58, 59, 60, 76, 83, 84, 103, 104, 107,	Pathogenesis-related protein P2	Sim	Apoplasto	Apoplasto
11	Basic endochitinase-like	Sim	Apoplasto	Apoplasto
12, 13, 90, 92, 93, 94, 95, 96	Receptor-like protein kinase-related family protein	Sim	Apoplasto	Apoplasto
16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 101, 105, 106, 108, 110, 114	Peroxidase 2	Sim	Apoplasto	Apoplasto
27, 28	Chain A, Peanut Peroxidase, Major Cationic Isozyme	Não	Apoplasto	Apoplasto
30, 37, 38, 44, 63, 64, 67, 73, 133, 134	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein isoform 1	Não	Citoplasma	Apoplasto
44	Multicopper oxidase, type	Sim	Apoplasto	Apoplasto
45	Laccase 14, putative isoform 3	Sim	Apoplasto	Apoplasto
49	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein, putative	Sim	Membrana celular	Apoplasto
33, 56, 131	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein isoform 2	Não	Citoplasma	Apoplasto
78	21 kDa seed protein	Sim	Apoplasto	Não apoplástica
81	trypsin inhibitor, partial	Não	Apoplasto	Não Apoplástica
121	Cellulase protein isoform	Sim	Apoplasto	Apoplasto

127	non-specific lipid-transfer protein-like protein At2g13820	Sim	Membrana Celular	Apoplasto
99	PREDICTED: endochitinase EP3	Sim	Lisossomos/ vacúolo	Apoplasto

Tabela 4. Predição de localização celular das proteínas de fluido apoplástico do genótipo Catongo de *T. cacao*.

Nº SPOT	Nome da proteína	SignalP	DeepLoc-1.0	ApoplastP
3	laccase-14-like	Sim	Apoplasto	Apoplasto
14, 15, 19, 20	21 kDa seed protein	Sim	Apoplasto	Não apoplástica
25, 29, 57	Pathogenesis-related protein P2	Sim	Apoplasto	Apoplasto
22	PREDICTED_ 21 kDa seed protein	Sim	Apoplasto	Não apoplástica
23	21 kDa seed protein	Sim	Apoplasto	Não apoplástica
16	PREDICTED_ pathogenesis-related protein PR-4A	Sim	Apoplasto	Apoplasto
35	Peroxidase 2	Sim	Apoplasto	Não apoplástica
37, 38 e 39	Peroxidase superfamily protein, putative	Sim	Apoplasto	Não apoplástica
59	Multicopper oxidase, type 1	Sim	Apoplasto	Apoplasto
4	Laccase 14, putative isoform 3	Não	Apoplasto	Apoplasto
13, 55	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein isoform 1	Não	Citoplasma	Apoplasto
9, 10, 12	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein isoform 2	Não	Citoplasma	Apoplasto

5.7. Metabolismo antioxidativo

5.7.1. Atividade da Peroxidase do Guaiacol (GPX)

A atividade da enzima GPX foi avaliada utilizando o FA bruto coletado em água destilada de dois genótipos contrastantes para a resistência à VB, sob duas condições: controle (CV), sob abrigo de chuva e CP. Apesar das árvores utilizadas para coleta das folhas apresentarem sintomas de VB verde e seca, as folhas coletadas para a extração foram maduras sem sintomas aparente.

A enzima foi analisada em meio a uma reação com guaiacol, sendo este o único doador de elétrons para a redução de H_2O_2 . Não houve diferenças significativas entre os genótipos independente das condições citadas. Por outro lado, ocorreram diferenças dentro dos genótipos de acordo com suas condições ambientais. Houve um aumento significativamente ($p < 0,05$) maior no genótipo CCN-51 em condições de campo com relação ao de condições controle. Bem como, um aumento significativamente ($p < 0,01$) maior no genótipo Catongo em condições de campo com relação a condições controle (Figura 9).

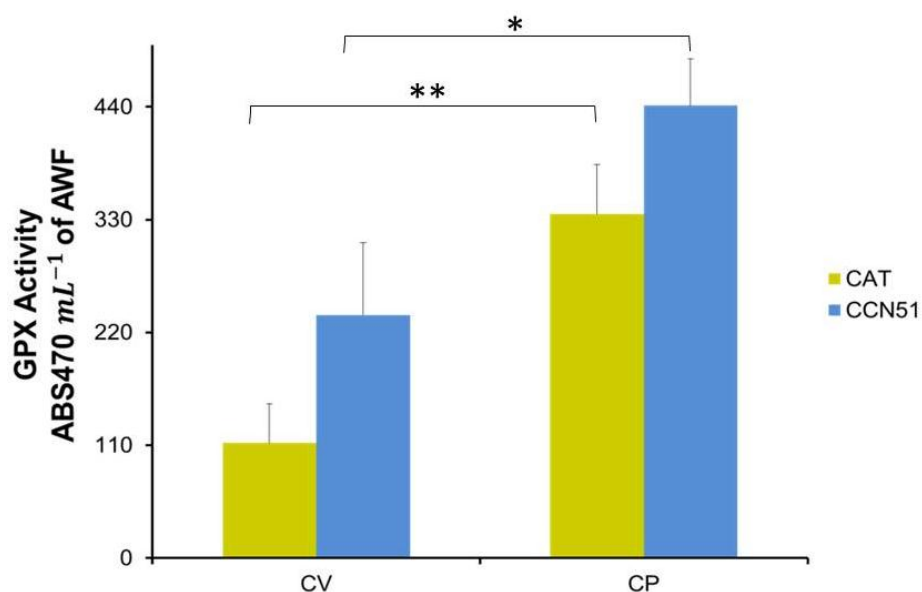


Figura 9. Atividade da Peroxidase do Guaiacol (GPX), em fluido apoplástico de genótipos de cacau em condições controle e de campo: Catongo- suscetível e CCN-51- resistente à vassoura de bruxa. Os pontos representam as médias das quadruplicatas das análises de cada variedade. * Significância de $p < 0,05$ e ** significância $p < 0,01$ no teste da ANOVA. CAT: genótipo Catongo; CCN51: genótipo CCN-51; CV: casa de vegetação e CP: campo. As barras correspondem aos erros padrões das médias.

5.7.2 Atividade da Peroxidase do Ascorbato (APX)

O FA utilizado na dosagem da enzima peroxidase do ascorbato (APX), segue os mesmos princípios da realizada com GPX (citado acima). Neste caso o ácido ascórbico é o doador de elétrons para a redução do H_2O_2 . Estatisticamente, não houve diferenças significativas entre e dentro dos genótipos, independente das condições ambientais propostas (Figura 10).

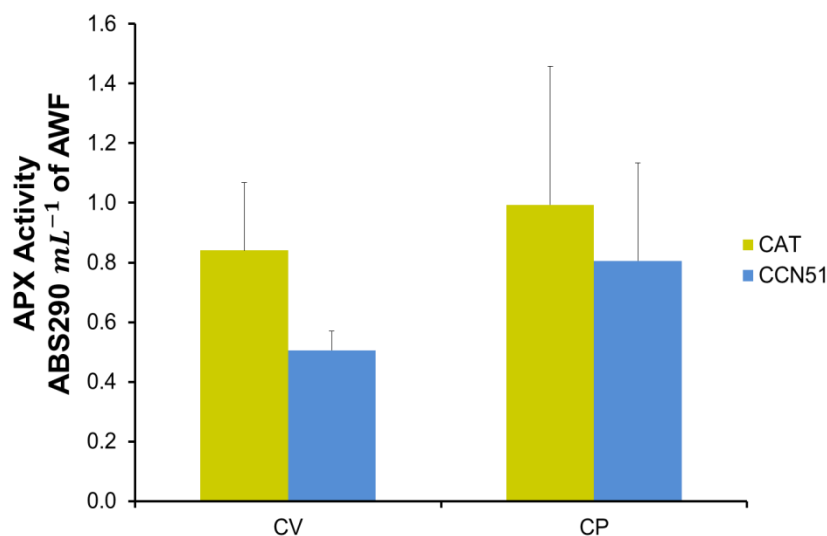


Figura 10. Atividade da Peroxidase do Ascorbato (APX), em fluido apoplástico de genótipos de cacau em condições controle e de campo: Catongo- susceptível e CCN-51- resistente à vassoura de bruxa. Os pontos representam as médias das quadruplicatas das análises de cada variedade. Não houve diferenças significativas no teste da ANOVA (NS). CAT: genótipo Catongo; CCN51: genótipo CCN-51; CV: casa de vegetação e CP: campo. As barras correspondem aos erros padrões das médias.

5.8. Efeito do FA na germinação dos basidiósporos de *M. perniciosa*

A germinação dos basidiósporos de *M. perniciosa* foi avaliada na presença do FA de dois genótipos de cacau CV e CP. A figura 12 mostra os basidiósporos 4 h após inoculação em meio ágar-água na presença de água (Figura 11A), a fim de avaliar a viabilidade dos esporos. Na presença de FA do genótipo CCN-51 (Figura 11B) e de FA do genótipo Catongo (Figura 11C), ambos CP. Os asteriscos (Figura 11A) indicam a localização dos basidiósporos germinados do controle, demonstrando maior quantidade de germinação e esporos viáveis. As setas vermelhas (Figura 11B) mostram os “corpos” (parte globulosa) dos esporos e as setas pretas indicam, possivelmente, rompimento de membrana do tubo germinativo ocasionado pela presença de FA do genótipo resistente.

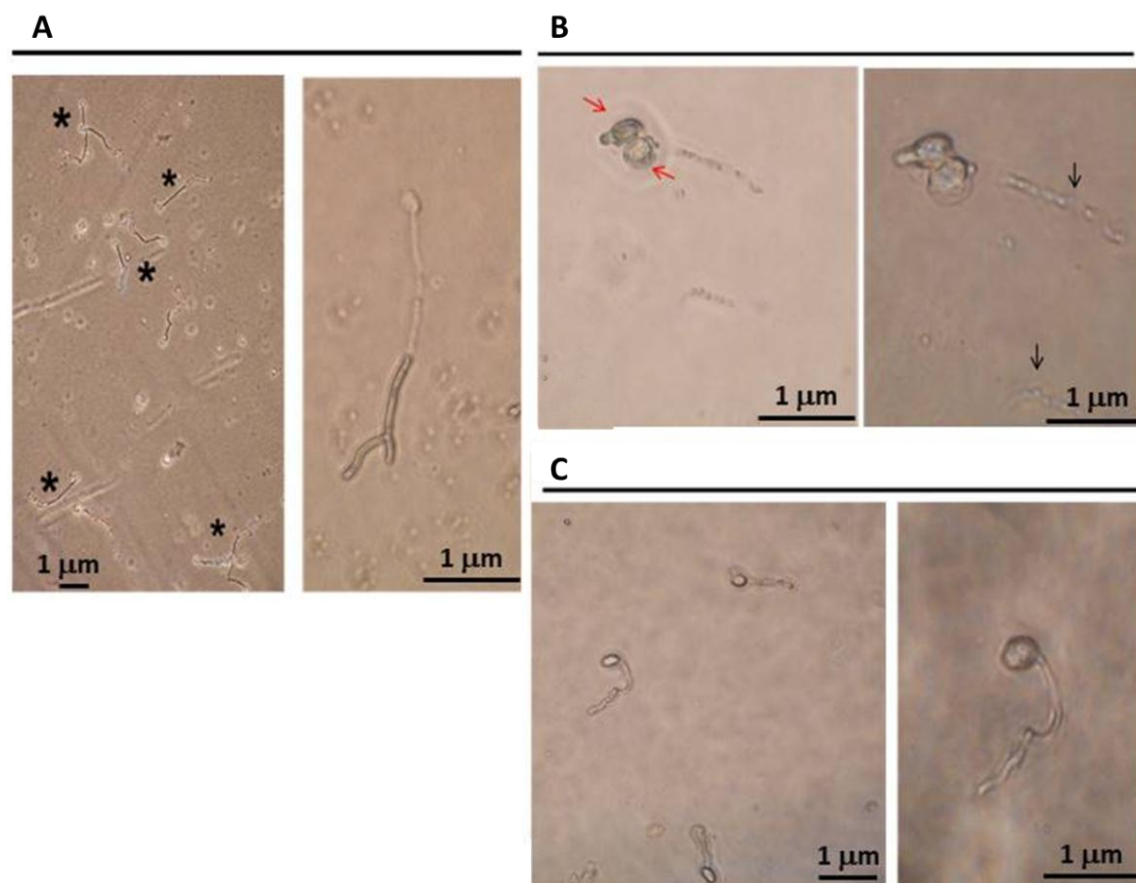


Figura 11. Germinação de esporos de *M. perniciosus* na presença de fluido apoplástico 4h após a inoculação. A: Controle, inoculado em água. B: Germinação na presença de FA de CCN-51 em condições de campo. C: Germinação na presença de FA de Catongo em condições de campo. * Esporos germinados no controle; Setas vermelhas indicam “corpo” do esporo; Setas pretas indicam possíveis rompimentos de membrana do tubo germinativo do esporo.

Após a interrupção da germinação, os basidiósporos germinados e não germinados de cada lâmina foram contados e suas porcentagens estabelecidas. Para cada tratamento mais o controle foram utilizadas 6 lâminas e 18 gotas (três em cada lâmina) com amostras (totalizando 30 lâminas e 90 gotas). A figura 12 mostra a porcentagem de germinação dos basidiósporos. Na amostra controle, inoculado em

água, houve 74 % de germinação. Nas amostras inoculadas na presença do FA do genótipo CCN-51 CP, a germinação foi de 10,5 %, 17,4 % para Catongo CP, 12,6 % para CCN-51 e 13,2 % para Catongo, ambos CV.

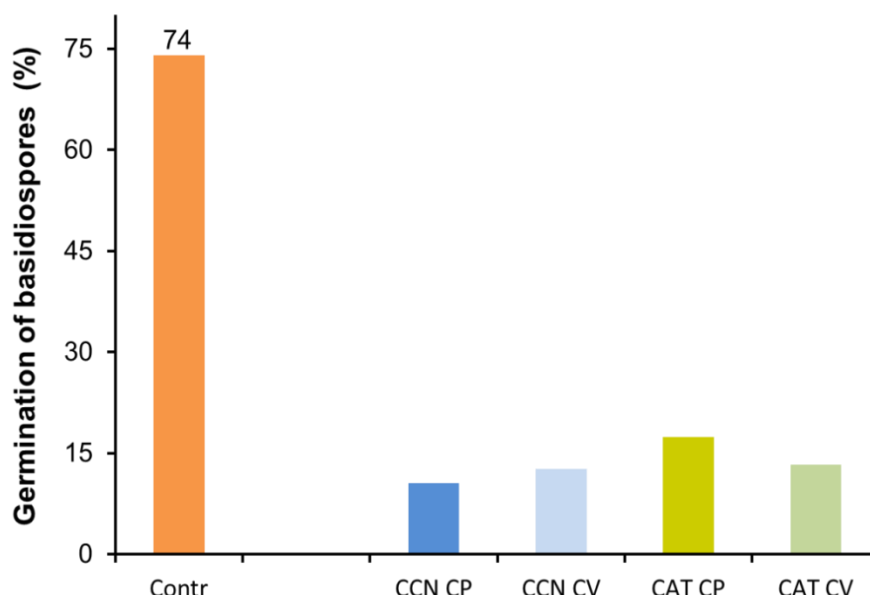


Figura 12. Porcentagem de germinação dos basidiósporos de *M. perniciosa* na presença de FA de genótipos contrastantes de *T. cacao*. Contr.: Amostra controle; CCN CP e CCN CV: genótipo CCN-51 em condições de campo e condições controle (casa de vegetação), respectivamente; CAT CP e CAT CV: genótipo Catongo em condições de campo e condições controle (casa de vegetação), respectivamente.

Já a figura 13 mostra a porcentagem de inibição dos basidiósporos na presença do FA. As porcentagens foram estabelecidas de acordo os resultados obtidos da germinação com o teste de viabilidade (controle). Estatisticamente, não houve diferenças significativas entre e dentro dos genótipos independente das condições ambientais de coleta. Todas as amostras demonstraram uma boa inibição dos esporos, o que indica compostos importantes presentes no FA de *T. cacao* na interação com o fungo *M. perniciosa*. Para os genótipos CP, a inibição foi de 89,5 % e 82,6 %, CCN-51 e Catongo, respectivamente. Para os genótipos CV a inibição foi de 87,4 % e 86,8 %, CCN-51 e catongo, respectivamente.

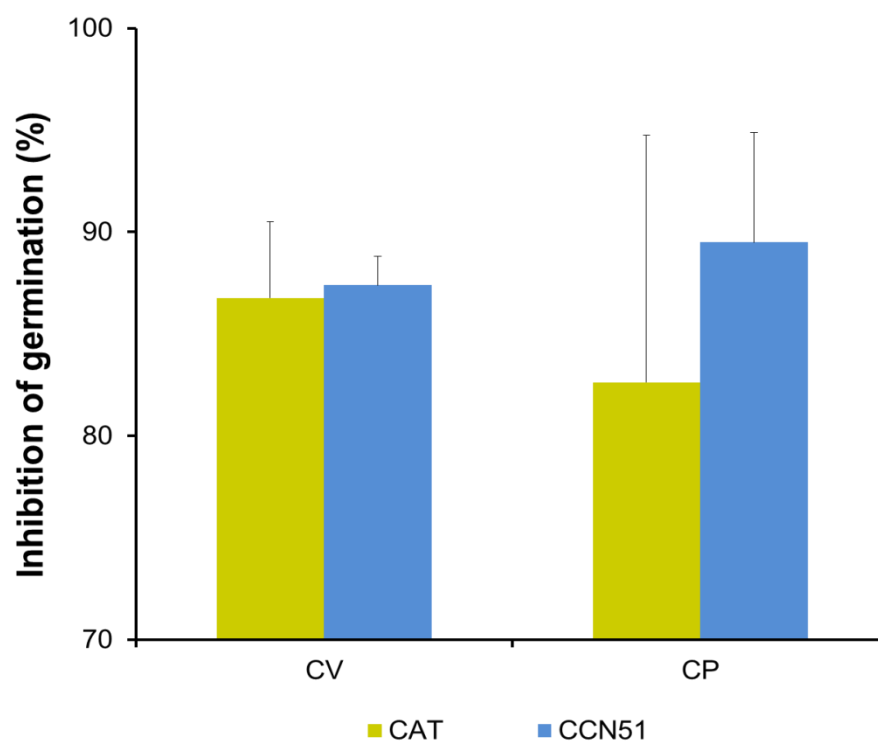


Figura 13. Porcentagem de inibição da germinação dos basidiósporos de *M. perniciosa* na presença de FA de genótipos contrastantes de *T. cacao*. CAT: genótipo Catongo; CCN: genótipo CCN-51; CV: condições controle (casa de vegetação); CP: condições de campo.

6. DISCUSSÃO

Nosso trabalho, centrado na análise proteômica de FA de dois genótipos contratantes de cacau quanto à resistência à vassoura-de-bruxa, se configura como promissor dentro da pesquisa científica, pois apresenta o primeiro perfil proteico de FA de *Theobroma cacao* em resposta ao fungo *Moniliophthora perniciosa*.

6.1. A infiltração a vácuo seguida de centrifugação é eficiente para extração de fluido apoplástico de cacauzeiros dos genótipos CCN-51 e Catongo

O presente trabalho foi baseado no protocolo otimizado por Pirovani et al. (2008) para folhas de cacau e, assim, foi possível isolar e estabelecer o primeiro mapa proteômico de fluido apoplástico (FA) de cacau dos genótipos resistente (CCN-51) e suscetível (Catongo) à VB.

Por meio da extração do FA e a identificação das proteínas a partir de géis bidimensionais, foi possível obter o primeiro perfil proteico de FA de *T. cacao* (Figura 3). As bandas proteicas reveladas em SDS-PAGE demonstraram eficiência no método de extração, fenol/SDS denso, utilizado, bem como diferenças importantes entre os perfis proteicos das amostras. A amostra de extrato total de folha (ET) revelou maior número de bandas proteicas do que as amostras de proteínas do FA. Além disso, algumas bandas que foram observadas no ET de folhas do cacauzeiro (aproximadamente 15, 29 e 55 kDa) estão ausentes ou em baixa intensidade nas amostras de FA. A banda proeminente de aproximadamente 55 kDa, comum de amostras foliares de muitas espécies de planta, revela a subunidade grande da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase (Rubisco) (DELANNOY et al., 2008; PIROVANI et al., 2008), a qual foi detectada com alta intensidade somente na amostra do ET. Este resultado indica livre ou baixa contaminação das amostras de FA coletado no presente estudo.

6.2. Genótipos de cacau contrastantes para a resistência à vassoura de bruxa apresentam perfil proteômico distinto no apoplasto

Como já relatado, a obtenção das proteínas do apoplasto sem danificar as células demonstra um trabalho dificultoso dado à complexidade em evitar rompimento da parede celular e membrana plasmática para impedir a contaminação por interferentes do meio intracelular (AGRAWAL et al., 2010; DELANOIS et al., 2014). Contudo, foi possível o estabelecimento de perfis proteico de FA em géis 2-D, onde foi observado maior número de *spots* no genótipo resistente à VB (CCN-51) em comparação com o genótipo suscetível (Catongo) (Figura 4). As técnicas utilizadas foram eficazes na obtenção do rendimento de massa proteica suficiente para as triplicadas dos géis 2-D.

O genótipo de cacau resistente à VB, CCN-51, apresentou um maior número de *spots* proteicos no apoplasto (Figura 5). Foram detectados mais que o dobro de *spots* em comparação com o genótipo suscetível. Em trabalho com folhas de *Coffea arabica* na interação com fungo *Hemileia vastatrix*, foi relatado que o maior número de proteínas de FA detectado também pertencia à variedade resistente de café, principalmente em uma fase específica da resposta de defesa da planta, na fase tardia ou 72-96 horas após inoculação com *H. vastatrix* (GUERRA-GUIMARÃES et al., 2015).

A proteômica apresenta algumas limitações, ainda que baseada em gel 2D-PAGE acoplada com espectrometria de massas, porém é considerada como uma grande ferramenta na identificação de proteínas em larga escala de amostras biológicas complexas (WILKINS et al., 1996; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, et al., 2010; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; PRATS; JORRÍN-NOVO, 2010; GUERRA-GUIMARÃES et al., 2015). Além de ser uma técnica bastante laboriosa, muitas proteínas presentes em baixa abundância são difíceis de detectar em misturas complexas, sendo assim, na técnica sempre haverá falhas na detecção de certas proteínas. Tratando-se de proteínas apoplásticas, essa dificuldade de detecção aumenta ainda mais, pois como se trata de proteômica subcelular, voltada para identificação de proteínas no compartimento apoplástico, a concentração de proteínas é inferior em comparação com a concentração no meio intracelular (QUIRINO et al., 2010) sendo, portanto difícil detectar. Além disso, muitas proteínas menos abundantes presentes são frequentemente mascaradas por aquelas produzidas em níveis mais altos. Por outro lado, uma das vantagens é poder relacionar as proteínas a um compartimento

funcional de células do vegetal (apoplasto) e reduzir a complexidade dos extratos proteicos teciduais, como a presença de polissacarídeos que interferem na resolução do gel (BRUNET et al., 2003; QUIRINO et al., 2010; DELAUNOIS et al., 2013).

A distribuição dos *spots* quanto a massa molecular indicou que a maioria das proteínas possuem menos de 30 kDa, para o genótipo CCN-51 e acima de 66 kDa, para o genótipo Catongo (Figura 6). Neste caso, a quantidade de proteínas com alto peso molecular em Catongo pode ter, provavelmente, interferido na detecção de outras proteínas de baixo peso devido sua maior abundância e maior nível de expressão, mascarando assim, proteínas menores e com baixo nível de expressão.

Na distribuição dos *spots* quanto ao ponto isoelétrico (pI) ocorreu o mesmo padrão para os dois genótipos, onde a maioria dos *spots* detectados no gel foi visualizada entre os valores de pI de 4 a 5 (Figura 7). Esse aumento do número de proteínas de baixo pH, pode ser explicado pelo fato do apoplasto ser um compartimento de pH relativamente baixo que, apesar de variar dependendo da espécie e tecido, em geral é considerado ácido com valores de pH entre 5 e 6, como em folhas de *Brassica napus* (pH 5.8), *Helianthus annuus* (pH 6.1- 6.3) (FELLE, 2001) e em batata (*Solanum tuberosum*) com pH de 6.1 (OJA et al., 1999). Além disso, estes resultados também corroboram com o trabalho de Guerra-Guimarães et al. (2016), onde concluíram que as proteínas do apoplasto apresentam-se com pI ácido (2-6) quando solúveis ou com baixa ou nenhuma interação com componentes da parede celular e com o trabalho de Nasser et al. (1990), onde concluíram que algumas PR-proteínas em geral são estáveis em baixo pH e quando ácidas se concentram geralmente no apoplasto em *Nicotiana tabacum*, como 1,3-β-glucanases (PR-2) e quitinases.

6.3. A maior parte das proteínas detectadas no apoplasto do cacaueiro é envolvida com processos de defesa

A grande maioria dos peptídeos sequenciados por MS/MS apresentaram correspondência com proteínas de *Theobroma cacao*, devido ao amplo sequenciamento dos genótipos de cacau Criollo (ARGOUT et al., 2017) e Matina (MOTAMAYOR et al., 2013). No conteúdo apoplástico foi possível observar

variações entre as proteínas detectadas e identificadas entre os genótipos resistente e suscetível. Tais proteínas foram categorizadas de acordo com os processos biológicos, os quais demonstram a importância do apoplasto especialmente em relação à defesa contra o patógeno. Esta classificação será discutida nos pontos abaixo.

6.3.1. O apoplasto do cacau é rico em proteínas de defesa e estresse

Em ambos os genótipos, a maioria das proteínas identificadas estão relacionadas à defesa e estresse de *T. cacao*. Para o genótipo CCN-51 foi 81 % (Figura 8) (equivalente a 68 proteínas) para Catongo 67 % (Figura 9) (equivalente a 20 proteínas) envolvidas no processo de defesa e estresse da planta.

Peroxidases (EC 1.11.1.7) foram detectadas em altas proporções em ambos os genótipos. Alguns *spots* foram facilmente visualizados devido ao tamanho. Estas proteínas foram detectadas nos *spots* 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 101, 105, 106, 108, 110, 114, 27, 28 (CCN-51) e 35, 36, 37, 38, 39 (Catongo) (Tabelas 1 e 2, respectivamente). As peroxidases são bem estudadas e já foram identificadas no apoplasto de alguns vegetais, como em milho (WITZEL et al., 2011) e arroz (*Oryza sativa*) em resposta ao estresse salino (ZHANG et al., 2009) e mostrou aumento de acúmulo no apoplasto de *Brassica napus* em resposta ao fungo *Verticillium longisporum* (FLOERL et al., 2008). No FA de folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) crescidas em condições controle foi mostrada uma grande atividade desta proteína (RATHMELL; SEQUEIRA, 1973).

As peroxidases são PR- proteínas pertencentes à família PR-9 (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999) e possuem atividade enzimática no processo de indução a resistência, como no fortalecimento das paredes celulares das plantas, por ação da biossíntese de lignina em resposta ao ataque microbiano (MATERN; KNEUSEL, 1988; NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992; YOUNG et al., 1995; VAN LOON; VAN STRIEN, 1999; STANGARLIN et al., 2011), deposição de suberina, polissacarídeos e glicoproteínas na parede celular, bem como produção de fitoalexinas e eliminação de espécies reativas de oxigênio (discutido mais adiante) (HIRAGA et al., 2001). Este mesmo autor propõe que existem diversas isoenzimas desta proteína que apresentam sequências de aminoácidos variáveis, como detectados nos *spots* 28 e 114 no genótipo CCN-51 e 37 e 38 do genótipo Catongo,

no presente trabalho, as quais podem ser distinguidas pelos seus pontos isoelétricos (pI). Ito et al. (1991) distinguiram 21 isoenzimas de peroxidases em arroz por meio da focalização isoelétrica e concluíram que há, pelo menos, quatro genes para peroxidases nesta mesma espécie. Em cacau foi mostrado a presença e a atividade da proteína peroxidase em duas variedades de cacau contrastantes para resistência à VB: Catongo (suscetível) e TSH1188 (resistente) e, por meio de análise filogenética, confirmou que há oito genes para peroxidases em cacau (CAMILLO et al., 2013).

As peroxidases podem ser secretadas para o apoplasto dentre as quais, muitas isoenzimas são induzidas por infecção por patógenos o que sugere que estas participam especificamente em processos de defesa da planta (HIRAGA et al., 2001). Com isso, inferimos que o acúmulo desta proteína no apoplasto pode ocorrer de forma induzida, visto que as plantas utilizadas neste trabalho estavam elicitadas pelo fungo *M. pernicioso* e, portanto, está relacionada diretamente na defesa do cacau e na modificação da parede celular, podendo ser encontrada tanto em genótipos resistentes quanto em suscetíveis à VB.

Apesar deste trabalho não usar a proteômica comparativa entre tratamentos distintos, utilizamos dois genótipos e um único tratamento (elicitados pelo fungo crescidos em campo) e não ser possível inferir mudanças nos níveis de expressão da proteína, foi possível notar visualmente um grande acúmulo de proteínas em ambos os genótipos, como nos *spots* 4, 5, 6, 7, 10, 25, 53, 54, 57, 58, 59, 60, 76, 83, 84, 103, 104, 107 em CCN-51 e nos *spots* 17, 18, 33, 25, 29, 30, 57 em Catongo, onde também identificamos como PR-proteínas, as PR-2 (β - 1, 3-glucanases).

As PR-2 foram as principais proteínas encontradas no FA em ambos os genótipos, representando 21% em CCN-51 e 22 % em Catongo das proteínas totais identificadas por espectrometria de massas. Isto está de acordo com Van Loon (1997), que afirma que PR-proteínas se acumulam nos tecidos das plantas a níveis que são facilmente detectáveis em géis, diferentemente de outros tipos de proteínas de estresse. Além destas proteínas, a PR-4 (quitinase classe II) foi identificada em CCN-51 (*spot* 11) e em Catongo (*spot* 16) e as endoquitinases, também foram identificadas em CCN-51 (*spot* 99).

As β - 1, 3- glucanases (EC 3.2.1.39) e as quitinases (EC: 3.2.1.14) possuem atividade de degradação da matriz da parede celular fúngica, β - 1, 3-glucanos e

quitina, respectivamente. E assim, os fragmentos gerados por essa degradação atuam como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) acionando os mecanismos de defesa da planta (BOLLER; FELIX, 2009; DELAUNOIS et al., 2014; GUERRA-GUIMARÃES et al., 2016). Portanto, estas proteínas possuem importante função no apoplasto do cacau na fase inicial de infecção por *M. pernicioso*, o que favorece uma cascata de sinais acionando genes importantes relacionados à defesa da planta. Em contrapartida, o fungo também aciona respostas cruciais na infecção e em seu estabelecimento no hospedeiro, como a produção de moléculas efetoras. Um gene para quitinase (*MpChi*) é expresso pelo fungo *M. pernicioso*, especificamente na fase biotrófica da doença. Curiosamente, o *MpChi* possui mutações, as quais propiciaram capacidade de ligação com quitina sem atividade quitinolítica, com provável função de proteção da parede fúngica contra as enzimas produzidas pelas plantas (FIORIN et al., 2018). Além disso, a imunidade desencadeada pelo PAMP (PTI), que ocorre após o reconhecimento de PAMPs pela planta foi avaliada em células de tabaco, a qual foi suprimida pela ação de *MpChi* quando ligadas a oligômeros de quitina (FIORIN et al., 2018).

Os PAMPs são reconhecidos pelos PRRs (Receptores de Reconhecimento de Padrões), que são proteínas transmembranas, onde identificamos somente em CCN-51: as proteínas quinases (*spots* 12, 13, 90, 92, 93, 94, 95, 96) e proteína rica em leucina (*spot* 70). Nossos achados sugerem uma eficiência maior para o genótipo CCN-51 com relação ao reconhecimento do patógeno, devido a fácil detecção destas proteínas neste genótipo. Neste sentido, possivelmente, a planta pode realizar um rápido reconhecimento do patógeno após a invasão, consequentemente podendo ocasionar uma rápida resposta levando uma maior resistência ao estabelecimento da doença VB. Porém, concordamos que o genótipo suscetível também possui um sistema de reconhecimento, confirmado pela presença da proteína quinase ativada por mitógenos em ambos os genótipos (*spots* 100 e 124 em CCN-51 e *spot* 34 em Catongo). Segundo Eschen-Lippold et al. (2012) após o reconhecimento das PAMPs em *Arabidopsis thaliana*, ocorre os primeiros sinais levando a ativação da produção de proteínas quinase ativada por mitógenos.

A proteína osmotina pertencente à família PR-5 (*spots* 2, 87, 88) foi detectada somente no genótipo CCN-51. As osmotinas pertencem a um subgrupo dentro da família das proteínas taumatinas (EC 3.2.1.x). Elas podem se acumular no apoplasto

ou vacúolo de forma induzida ou constitutiva. Sob estresse biótico ou abiótico, os níveis desta proteína são aumentados. Alguns trabalhos comprovaram a capacidade de toxicidade da osmotina contra fungos. A sua atividade antifúngica foi relatada pela ruptura de membrana do patógeno ou hidrólise de β -1,3-glucanos (ABAD et al., 1995; YUN et al, 1998; GRENIER et al., 2002; GUERRA-GUIMARÃES et al., 2016). A expressão de osmotina foi detectada em maior acúmulo no apoplasto de folhas de café em genótipo resistente logo na fase inicial de infecção, em 24 horas após inoculação com o patógeno *Hemileia vastatrix*. Já no genótipo suscetível, a concentração de osmotina aumentou em 96 horas após inoculação (GUERRA-GUIMARÃES et al., 2015). Assim, sugerimos que a expressão desta proteína, provavelmente ocorra nos períodos iniciais de infecção em CCN-51 em resposta a *M. pernicioso*.

A superexpressão da osmotina em batatas transgênicas retardou o desenvolvimento dos sintomas da doença causada pelo patógeno *Phytophthora infestans* (LIU et al., 1994). A osmotina demonstrou capacidade contra uma variedade de patógenos fúngicos ao inibir o crescimento de hifas e a germinação de esporos *in vitro*, devido ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática fúngica, propondo que a superexpressão da osmotina pode aumentar os níveis de resistência em uma planta (ABAD et al., 1996). Com isso, podemos inferir que a osmotina, presente no apoplasto de CCN-51, pode estar relacionado com sua maior resistência à VB. Por outro lado, embora não tenha sido detectada esta proteína em Catongo a partir da análise proteômica, não podemos descartar a presença desta proteína no genótipo suscetível, visto que a expressão gênica de um organismo é muito dinâmica, os resultados obtidos refletem um dado momento específico deste organismo e somente parte das proteínas foram identificadas.

Outras proteínas que também só foram detectadas em CCN-51 (*spots* 49 e 127) foram as proteínas de transferência de lipídios pertencentes às PR-14. Como sugere o nome, esta proteína está relacionada com a transferência de fosfolipídios e outros lipídios por meio da membrana, mas também já foram relatadas que algumas podem exercer função antimicrobiana nos espaços extracelulares de muitas espécies de planta (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, 2002) podendo exercer tal função no apoplasto de cacau.

Duas isoformas das proteínas serina-proteases tipo subtilisina que também podem exercer função de defesa na planta, foram detectadas em ambos os genótipos. A isoforma 1 em CCN-51, nos *spots* 30, 37, 38, 44, 56, 63, 64, 67, 73, 133, 134 e em Catongo, nos *spots* 13 e 55 e a isoforma 2, *spots* 33 e 56 (CCN-51) e *spots* 9, 10 e 12 (Catongo). Protease tipo subtilisina foi detectada na parede celular de *Arabidopsis thaliana* (BOUDART et al., 2005), em FA de videira (DELAUNOIS et al., 2013) e em FA de folhas de café (GUERRA-GUIMARÃES et al., 2015). Segundo Figueiredo et al. (2014), as protease tipo subtilisina podem exercer a função de sinalização acionando diversos genes de defesa e também no desenvolvimento das plantas. O acúmulo desta proteína no apoplasto de cacau pode ser importante no processo de infecção por patógeno.

A detecção de um número repetido de uma mesma proteína no presente trabalho sugere a ocorrência de uma grande taxa de modificações pós traducionais como, fosforilação e glicosilação. Fato este também observado por Camillo (2013), com proteínas de *M. pernicioso* em resposta ao FA de cacau e Delaunois et al. (2013), com proteínas de FA de videira. Cerca de 30 % de proteínas de FA de álamo (*Populus spp.*) apresentaram formas glicosiladas o que provavelmente favorecia a solubilidade proteica e proteção contra proteólise (PECHANOVA et al. 2010).

6.3.2. Proteínas presentes no apoplasto estão envolvidas em processos metabólicos e oxirredução

Algumas proteínas identificadas no FA de cacau do genótipo CCN-51 também estão envolvidas em processos metabólicos (18 %) e de oxirredução em ambos os genótipos (7 % em CCN-51 e 12 % em Catongo).

A celulase (β -1,4-glucanase, EC 3.2.1.4) detectada em CCN-51 (*spot* 121) já foi relatada estar envolvida no metabolismo da parede celular em vias que resultam na quebra da celulose (DURBIN et al., 1981; FERRARESE et al., 1995; GLASS et al., 2015) como também já foi relatado que a abscisão de folhas em pêssago pode estar relacionada com o aumento desta proteína (BONGHI Et al., 1992).

Proteínas envolvidas em processos fotossintéticos não apoplásticas foram detectadas somente em CCN-51 como ATP sintase (*spots* 61 e 123), considerada uma proteína de metabolismo energético responsável por sintetizar ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (BOYER, 1997) e a subunidade pequena da RuBisCo

(spots 82, 119, 120), com 15 kDa (SPREITZER; SALVUCCI, 2002). A RuBisCo (EC:4.1.1.39) é uma das proteínas mais abundantes nos tecidos vegetais e é considerada a proteína mais abundante do mundo (SPREITZER; SALVUCCI, 2002) e portanto, sua detecção no FA é considerável devido o método de extração tolerar e prever mínima contaminação citoplasmática, como já mencionado.

Um tipo de proteína foi único em ambos os genótipos com atividade de oxirredução, a laccase (spots 45, 46, 68, 82, 119, 129 em CCN-51 e spots 3, 4, 59 em Catongo). Laccase (EC 1.10.3.2) é uma enzima encontrada em diversos organismos, como bactérias, fungos e plantas estando envolvida principalmente na função de degradação de lignina e desintoxicação de produtos derivados de lignina (GAVNHOLT; LARSEN, 2002; WEIRICK et al., 2014) e são proteínas consideradas extracelulares, assim como comprovamos que possuem um peptídeo sinal (Tabela 3 e 4). O gene que codifica para laccase provavelmente esteja presente em todas as plantas superiores e ainda em várias cópias, sendo que suas isoenzimas podem apresentar diferentes padrões de expressão e devido à expressão diferencial, as laccases podem exercer outras funções além da lignificação (GAVNHOLT; LARSEN, 2002; LITVINTSEVA; HENSON, 2002).

6.4. Metabolismo antioxidativo em fluido apoplástico de cacau

As plantas em condições normais produzem as chamadas espécies reativas de oxigênio (ROS: *Reactive Oxygen Species*). Estas ROS comuns ao metabolismo celular, como ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH) são bem estudadas e consideradas, quando em altos níveis, moléculas altamente tóxicas ao patógeno e às células, podendo ocasionar respostas negativas no desenvolvimento dos tecidos vegetal ou até mesmo a morte celular (MIKA et al., 2004; LIU et al., 2010; JWA; HWANG, 2017).

As ROS são consideradas participantes importantes na sinalização celular desencadeando respostas imunes nas plantas, mediante a ativação de genes de defesa. Acredita-se também que elas podem agir diretamente no patógeno, causando a morte ou até mesmo contribuir na formação de barreiras físicas, como participando na modulação da parede celular (TORRES, 2010).

Nas plantas, quando submetidas a estresse biótico ou abiótico, a produção de ROS é aumentada consideravelmente e com isso, caracteriza-se como excelentes moléculas de reconhecimento de patógenos (JWA; HWANG, 2017). O grande acúmulo dessas ROS são normalmente apoplásticas e ocorre nos locais de tentativa de ataque pelo patógeno. Elas são secretadas da célula de forma rápida, dentro de poucos minutos, logo após o sinal de estresse pelo reconhecimento dos PAMPs (TORRES, 2010; LIU et al., 2010). Como o aumento significativo das ROS também pode significar destruição das células, pois esta condição qualifica as células em um estado de “estresse oxidativo”, as plantas evoluíram estratégias para eliminá-las por meio de um sistema de desintoxicação realizadas por algumas enzimas, dentre elas, a peroxidase do guaiacol (GPX), peroxidase do ascorbato (APX), na tentativa de ocasionar um equilíbrio entre a produção de ROS e eliminação delas (SHARMA et al., 2012; SCANDALIOS et al., 2013). Ambas as enzimas foram avaliadas no presente trabalho.

A atividade da enzima GPX (EC 1.11.1.7) revelou diferenças significativas somente dentro dos genótipos de acordo com as condições ambientais já apresentadas. O genótipo CCN-51 em condições de campo mostrou um aumento significativamente ($p < 0,05$) maior do que o mesmo genótipo em condições controle, plantas cultivadas em casa de vegetação. O mesmo verificou no genótipo Catongo em condições de campo, o qual apresentou um aumento significativamente ($p < 0,01$) maior com relação ao genótipo em condições controle (Figura 10). Isto pode ser um indicativo de que genótipos sob condições normais, conseqüentemente menos estressados, expressam níveis baixos desta enzima e, por outro lado, os níveis aumentam na tentativa de atenuar os efeitos causados por estresses por patógenos, quando as plantas estão mais expostas à danos em campo.

A GPX é uma peroxidase que oxida o guaiacol podendo estar presente no citosol, parede celular, vacúolo e apoplasto (GHAMSARI et al., 2007). Como já discutido no presente trabalho, esta enzima está envolvida tanto com a função de reforçamento de parede celular como na síntese de lignina quanto na defesa contra estresses bióticos (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999; STANGARLIN et al., 2011; SHARMA et al., 2012). Diante disto, inferimos que ocorre uma resposta de modo simultâneo, ou seja, o aumento dessa enzima nos genótipos em condições de campo (estressantes) pode estar relacionando com as duas funções supracitadas.

Acreditamos que, após o reconhecimento do patógeno no apoplasto, esta enzima seja acionada para efetivar o remodelamento ou reforçamento da parede celular na tentativa de impedir a entrada do patógeno nas células vegetais. Diferentemente do que aconteceu com as plantas sob condições estressantes amenas (em casa de vegetação). A GPX é uma enzima de estresse, sendo induzida por muitas condições estressantes (SHARMA et al., 2012).

Com relação a APX (EC 1.1.11.1), trata-se da enzima redutora de H_2O_2 mais importante nas células (NOCTOR; FOYER, 1998). Mesmo havendo uma maior atividade desta enzima para o genótipo suscetível, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre e dentro dos genótipos de acordo com teste ANOVA, independente das condições apresentadas pelos genótipos (Figura 11).

Em trabalho anterior, a atividade de APX em tecidos de planta de cacau de duas variedades mostrou diferença, principalmente, em genótipo resistente à VB quando inoculados com *M. pernicioso* (CAMILLO et al., 2013). Em TSH1188 (genótipo resistente à VB) mostrou uma alta atividade de APX no início da infecção (3 dias após inoculação) e reduziu gradualmente até 55 dias após inoculação quando comparadas com a controle (não inoculados). Para o genótipo suscetível (Catongo) à VB, mostrou um leve aumento em 3 dias após inoculação e após este período não foi observado diferenças significativas estatisticamente (CAMILLO et al., 2013). Pirovani (2008) avaliou a atividade desta enzima em FA de genótipos resistente à VB (TSH 1188) e uma variedade suscetível (Catongo), sadios e inoculados com o fungo *M. pernicioso*. No início da infecção (3 dias após inoculação) foi demonstrado uma maior indução da enzima no genótipo resistente, seguido de redução aos 25 dias após inoculação. Em genótipo suscetível, aos 3 dias após inoculação, a atividade da enzima foi menor comparada com o controle (Catongo sadio), mas houve aumento aos 25 dias após inoculação. Esses dados diferem de nossos achados, provavelmente pela capacidade de *M. pernicioso* modular diferentemente a atividade dessa enzima em plantas que se encontram em diferentes situações, como as plantas inoculadas e constantemente monitoradas por Pirovani (2008) ou plantas em condições de campo, onde o período da instalação da VB é desconhecido, utilizadas no presente estudo.

6.5. FA de cacau inibe a germinação e causa alterações morfológicas em basidiósporos de *M. pernicioso*

Devido ao conhecimento da importância do apoplasto, sendo este considerado o local interno da planta onde ocorrem as primeiras interações moleculares entre patógeno/hospedeiro, sendo este primeiro contato no filoplasma (ALMEIDA, 2012), o presente trabalho avaliou a germinação de esporos de *M. pernicioso* quando reunidos em FA.

Em trabalho realizado por Ceita et al. (2007) com utilização de genótipo suscetível, foi demonstrado que o fungo *M. pernicioso* em sua fase biotrófica pode permanecer no apoplasto por um tempo que pode durar até 60 dias, até este progredir para fase necrotrófica, onde se beneficia matando as células vegetais e se alimentando delas. Diante disso, foi proposto que importantes constituintes estão presentes no apoplasto de cacau que podem ser determinantes nas respostas da planta e, por consequência no desenvolvimento do patógeno e prevenção de um rápido avanço e instalação da VB.

Imagens de microscópio óptico foram geradas e foi possível notar tubo germinativo completo, surgimento de ramificação e coloração escura (Figura 12A), demonstrando basidiósporos ativos (PIROVANI, 2008). Além disso, alterações morfológicas foram observadas nos basidiósporos crescidos na presença do FA, principalmente no genótipo CCN-51, como uma possível ruptura de membrana, o que sugere proteínas de FA do genótipo resistente atuando diretamente sobre o fungo na tentativa de evitar a instalação. Como destacado, a proteína osmotina detectada em CCN-51, está relacionada à patogênese vegetal com poder de inibição contra vários fungos. Abad et al. (1996) avaliaram *in vitro* a atividade antifúngica para 31 fungos na presença de osmotina e concluíram uma forte inibição na maioria dos isolados testados, sendo que essa inibição aumentava de acordo com a concentração da proteína no meio. Em complementação, estes autores também comprovaram a lise de esporos em hifas de cinco isolados de fungos, dos oito testados. Sendo assim, acreditamos que esta proteína esteja atuando especificamente com função de lise de membrana das hifas do *M. pernicioso* em CCN-51 sendo, portanto candidata a um marcador de resistência desta variedade.

Ao avaliarmos os basidiósporos do genótipo suscetível, não foi detectado rompimento celular dos tubos germinativos, em contrapartida verificamos tubos de

tamanhos mais curtos ao compará-los com os basidiósporos germinados em água. Algumas isoformas de quitinases e β - 1, 3- glucanases apoplásticas quando juntas demonstraram grande efeito de inibição fúngica. O FA de tabaco transgênico que continham ambas as enzimas, apresentaram lise quase completa do fungo *Fusarium solani* atuando nas pontas das hifas, após 2h de inoculação e após 3 dias uma inibição do crescimento quase total do fungo (SELA-BUURLAGE et al., 1993). Com isso, sugerimos candidatas atuantes no FA de cacau contra o fungo *M. perniciosa*, visto que comprovamos sua expressão tanto no genótipo resistente quanto no suscetível. Além disso, ao estabelecermos a porcentagem de inibição fúngica, não foi verificada diferença significativa estatisticamente entre e dentro dos genótipos independente das condições ambientais de coleta (campo ou casa de vegetação). Porém, nota-se que o genótipo CCN-51 em condições de campo possui uma inibição maior que o genótipo Catongo nas mesmas condições. Já os genótipos em condições controladas (casa de vegetação) a diferença entre os dois genótipos são mínimas. Sugerindo que compostos importantes do apoplasto podem atuar em conjunto e ser efetivos contra o fungo *M. perniciosa* em cacau.

7. CONCLUSÕES

- O apoplasto dos genótipos de cacau, CCN-51 e Catongo, apresentam perfis proteicos distintos;
- A maior parte das proteínas presentes no apoplasto de dois genótipos do cacaueiro está envolvida com processos de defesa;
- A proteína osmotina detectada em CCN-51 é uma possível candidata a um marcador de resistência deste genótipo;
- A infecção do cacaueiro por *Mp* promoveu aumento na atividade da enzima GPX envolvida no metabolismo antioxidativo;
- Constituintes presentes no apoplasto de CCN-51 e Catongo induzem alterações morfológicas do tubo germinativo de *Mp*, incluindo ruptura de membrana na presença de FA do genótipo resistente à VB.

REFERÊNCIAS

- ABAD, L. R., D'URZO, M. P., LIU, D., NARASIMHAN, M. L., REUVENI, M., ZHU, J. K. & BRESSAN, R. A. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Science*, 118(1), 11-23, 1996.
- AGRAWAL, G. K.; JWA, N.S.; LEBRUN, M.H.; JOB, D.; RAKWAL, R. Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. **Proteomics**, v.10, p.799-827, 2010.
- AGRIOS, G. N. *Plant pathology*. New York: Academic Press, p. 635, 2005.
- AIME, M.C. & PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, 97 (5): 1012-1022, 2005.
- ALMEIDA, A D.S.M. **Identificação de proteínas do filopiano do *Theobroma cacao* L.** [Dissertação de conclusão do curso de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular]. Ilhéus, Universidade Estadual de Santa Cruz, 2012.
- ALMEIDA, A-A. F. and VALLE, R. R. Ecophysiology of the cacao tree. *Braz. J. Plant Physiol.*, 19(4):425-448, 2007.
- ALMEIDA, B. S. V. **Análise do proteoma do fluido intercelular de folhas de laranjeiras infectadas com *Xylella fastidiosa*.** [Dissertação de conclusão do curso da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz]. Piracicaba, Universidade de São Paulo, 2001.
- ALMEIDA, D. S. M *et. al.* Cacao Phylloplane: The First Battlefield against *Moniliophthora perniciosa*, Which Causes Witches' Broom Disease. *Phytopathology*, vol. 107, n. 7, 2017a.
- ALMEIDA, D. S. M., GRAMACHO, K. P., CARDOSO, T. H. S., MICHELI, F., ALVIM, F. C., & PIROVANI, C. P. Cacao Phylloplane: the first battlefield against *Moniliophthora perniciosa*, which causes witches' broom disease. *Phytopathology*, 107(7), 864-871, 2017b.
- ALVERSON, W. S., WHITLOCK, B. A., NYFFELER, R., BAYER, C. and BAUM, D. A. Phylogeny of the core Malvales: evidence from ndhF sequence data. *Am. J. Botany*. 86:1474-1486, 1999.
- ARGOUT, X., MARTIN, G., DROC, G., FOUET, O., LABADIE, K., RIVALS, E. & LANAUD, C. The cacao Criollo genome v2. 0: an improved version of the genome for genetic and functional genomic studies. *BMC genomics*, 18(1), 730, 2017.
- BEG, M. S., AHMAD, S., JAN, K. and BASHIR, K. Status, supply chain and processing of cocoa- A review. *Trends in Food Science & Technology*, 66, 108-116, 2017.

BENDTSEN, J.D.; NIELSEN, H.; HEIJNE, G. and BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, v.340(4), p.783-795, 2004.

BENJAMIN, C. S., LUZ, E. D. M. N., SANTOS, W. O. e PIRES, J. L. Cacao families and parents selected as resistant to natural infection of *Moniliophthora perniciosa*. *Crop Breed. Appl. Biotechnol. SciElo*, vol.16 no.2 Viçosa Apr./June 2016.

BERNSTEIN, L. Method for determining solutes in the cell walls of leaves. *Plant Physiology*, 47(3), 361-365, 1971.
bioinformatics. *Proteomics*, 5(1), 212-221, 2005.

BOLLER, T., & FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology*, 60, 379-406, 2009.

BONGHI, C., RASCIO, N., RAMINA, A., & CASADORO, G. Cellulase and polygalacturonase involvement in the abscission of leaf and fruit explants of peach. *Plant molecular biology*, 20(5), 839-848, 1992.

BOUDART, G., JAMET, E., ROSSIGNOL, M., LAFITTE, C., BORDERIES, G., JAUNEAU, A. & PONT-LEZICA, R. Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: identification by mass spectrometry and
BOYER, P. D. The ATP synthase- a splendid molecular machine. *Annual review of biochemistry*, 66 (1), 717-749, 1997.

BRUNET, S., THIBAUT, P., GAGNON, E., KEARNEY, P., BERGERON, J. J., & DESJARDINS, M. Organelle proteomics: looking at less to see more. *Trends in cell biology*, 13(12), 629-638, 2003.

CALDAS, M. M. & PERZ, S. Agro-terrorism? The causes and consequences of the appearance of witch's broom disease in cocoa plantations of southern Bahia, Brazil. *Geoforum*, 47, 147-157, 2013.

CAMILLO, L. R. **Análise do perfil proteômico de *Moniliophthora perniciosa* em resposta ao fluido apoplástico de cacau e caracterização de uma ascorbato peroxidase de *Theobroma cacao*.** (Tese de doutorado da Universidade Estadual de Santa Cruz, 2013).

CEITA, G. O. *et. al.* Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Science**, v. 173: 106-117, 2007.

CHEN, S.; HARMON, A. C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, 5504–5516, 2006.

CHISHOLM, S. T., COAKER, G., DAY, B. and STASKAWICZ, B. J. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*. 124(4): 803-814, 2006.

COSTA, F. M., SOARES, N. S. (Org.). Cacao, riqueza de pobres. Ilhéus, BA: *Editus*, p. 286, 2016.

CUATRECASAS, J. **Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus Theobroma**. In *Systematic Plant Studies*. Contributions from the United States National Herbarium. DC: Smithsonian Institution Press, Washington, 35: 379-614, 1964.

DALIO, R. J. D. Deciphering mechanisms of pathogenicity and resistance induction in the interaction between *Phytophthora* spp. and European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Ph.D. Thesis. Technische Universitaet Muenchen (TUM)*, Freising, Germany, 2013.

DANI, V., WILLIAM, J., DURANTI, M. and CROY, R. Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. *Proteomics*. 5, 737–745, 2005.

De ALMEIDA, S. M., Do AMARAL, D., DEL-BEM, D. O. J., SANTOS, L. E., E. B., SILVA, S., JOSÉ, R. and MICHELI, F. Genome-wide identification and characterization of cacao WRKY transcription factors and analysis of their expression in response to witches' broom disease. *PloS One*, 12 (10): 23 p., 2017.

De WIT, P. J., BUURLAGE, M. B., & HAMMOND, K. E. The occurrence of host-pathogen-and interaction-specific proteins in the apoplast of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) infected tomato leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 29(2), 159-172, 1986.

DELAUNOIS, B., COLBY, T., BELLOY, N., CONREUX, A., HARZEN, A., BAILLIEUL, F., CLÉMENT, C., SCHMIDT, J., JEANDET, P. and CORDELIER, S. Large-scale proteomic analysis of the grapevine leaf apoplastic fluid reveals mainly stress-related proteins and cell wall modifying enzymes. *BMC Plant Biol.* 13: 24, 2013.

DELAUNOIS, B., JEANDET, P., CLÉMENT, C., BAILLIEUL, F., DOREY, S., & CORDELIER, S. Uncovering plant-pathogen crosstalk through apoplastic proteomic studies. *Frontiers in plant science*, 5, 249, 2014.

DIETZ, K. J. Functions and responses of the leaf apoplast under stress. **Progress in Botany**. Volume 58, pp 221-254, 1997.

DING, Y., WANG, J., WANG, J., STIERHOF, Y. D., ROBINSON, D. G., & JIANG, L. Unconventional protein secretion. *Trends in plant science*, 17(10), 606-615, 2012.
DOEHLEMANN, G., & HEMETSBERGER, C. Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytologist*, 198(4), 1001-1016, 2013.

DURBIN, M. L., SEXTON, R., & LEWIS, L. N. The use of immunological methods to study the activity of cellulase isozymes (B 1: 4 glucan 4-glucan hydrolase) in bean leaf abscission. *Plant, Cell & Environment*, 4(1), 67-73, 1981.

ESCHEN-LIPPOLD, L., BETHKE, G., PALM-FORSTER, M. A., PECHER, P., BAUER, N., GLAZEBROOK, J. & LEE, J. MPK11—a fourth elicitor-responsive

mitogen-activated protein kinase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant signaling & behavior*, 7(9), 1203-1205, 2012.

EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicios*a, causal agent of witches' broom disease of cocoa. *Transactions of the British Mycological Society*, 74(3), 515-523, 1980.

FECHE-CHRISTOFFERS, M., BRAUN, H. P., LEMAITRE-GUILLIER, C., DORSSELAER, A. and HORST, W. Effect of Manganese Toxicity on the Proteome of the Leaf Apoplast in Cowpea. *Plant Physiol.* Dec; 133(4): 1935–1946, 2003.

FELLE, H. H. pH: signal and messenger in plant cells. *Plant biology*, 3(06), 577-591, 2001.

FERRARESE, L., TRAINOTTI, L., MORETTO, P., DE LAURETO, P. P., RASCIO, N., & CASADORO, G. Differential ethylene-inducible expression of cellulase in pepper plants. *Plant molecular biology*, 29(4), 735-747, 1995.

FERREIRA, A. C. R., AHNERT, D., NETO, B. A. M. e MELLO, D. L. N. **Guia de Beneficiamento de Cacau de Qualidade Instituto Cabruca**. Ilhéus, Bahia: 2013.

FIGUEIREDO, A., MONTEIRO, F., & SEBASTIANA, M. Subtilisin-like proteases in plant-pathogen recognition and immune priming: a perspective. *Frontiers in plant science*, 5, 739, 2014.

FIORAVANTI, C. H., & VELHO, L. Fungos, fazendeiros e cientistas em luta contra a vassoura-de-bruxa. *Sociologias*, 2011.

FIORIN, G. L., SANCHEZ-VALLET, A., DE TOLEDO THOMAZELLA, D. P., DO PRADO, P. F. V., DO NASCIMENTO, L. C., DE OLIVEIRA FIGUEIRA, A. V. & TEIXEIRA, P. J. P. L. Suppression of Plant Immunity by Fungal Chitinase-like Effectors. *Current Biology*, 28(18), 3023-3030, 2018.

FLOERL, S., DRUEBERT, C., MAJCHERCZYK, A., KARLOVSKY, P., KÜES, U., & POLLE, A. Defense reactions in the apoplastic proteome of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) attenuate *Verticillium longisporum* growth but not disease symptoms. *BMC Plant Biology*, 8(1), 129, 2008.

FREIRE, L., Santana. J. O., SOUSA, O. A., SANTOS, B. J., OLIVEIRA, I. B., ALVIM, F.C., GRAMACHO, K. P., COSTA, M. G. C., PIROVANI, C. P., TcPHYLL, a cacao phylloplanin expressed in young tissues and glandular trichomes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 06.002., 2017.

FREITAS, A. C. O., SOUZA, C. F., MONZANI, P. S., GARCIA, W., de ALMEIDA, A. A. F., COSTA, M. G. C., & PIROVANI, C. P. The Activity of TcCYS4 Modified by Variations in pH and Temperature Can Affect Symptoms of Witches' Broom Disease of Cocoa, Caused by the Fungus *Moniliophthora pernicios*a. *PloS one*, 10(4), e0121519, 2015.

GAVNHOLT, B., & LARSEN, K. Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. *Physiologia plantarum*, 116(3), 273-280, 2002.

GEILFUS, C. M., MITHÖFER, A., LUDWIG-MÜLLER, J., ZÖRB, C., & MUEHLING, K. H. Chloride-inducible transient apoplastic alkalizations induce stomata closure by controlling abscisic acid distribution between leaf apoplast and guard cells in salt-stressed *Vicia faba*. *New Phytologist*, 208(3), 803-816, 2015.

GHAMSARI, L., KEYHANI, E., & GOLKHOO, S. Kinetics properties of guaiacol peroxidase activity in *Crocus sativus* L. corm during rooting. *Iranian Biomedical Journal*, 11(3), 137-146, 2007.

GLASS, M., BARKWILL, S., UNDA, F., & MANSFIELD, S. D. Endo- β -1, 4-glucanases impact plant cell wall development by influencing cellulose crystallization. *Journal of integrative plant biology*, 57(4), 396-410, 2015.

GONZÁLEZ, A. P. M. Proteomics Analysis of Plant Tissues Based on Two-Dimensional Gel Electrophoresis. In *Advances in Plant Ecophysiology Techniques* (pp. 309-322). Springer, Cham, 2018.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R., PRATS, E., & JORRÍN-NOVO, J. V. Proteomics of plant pathogenic fungi. *BioMed Research International*, 2010.

GOYA, L., MARTÍN, M. Á., SARRIÁ, B., RAMOS, S., MATEOS, R. and BRAVO, L. Effect of cocoa and its flavonoids on biomarkers of inflammation: studies of cell culture, animals and humans. *Nutrients*, 8(4), 212, 2016.

GRENIER, J., POTVIN, C., TRUDEL, J., & ASSELIN, A. Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric β -1, 3-glucans. *The Plant Journal*, 19(4), 473-480, 1999.

GUERRA-GUIMARÃES, L., PINHEIRO, C., CHAVES, I., BARROS, D. R., & RICARDO, C. P. Protein dynamics in the plant extracellular space. *Proteomes*, 4(3), 22, 2016.

GUERRA-GUIMARÃES, L., TENENTE, R. E. R., PINHEIRO, C. C., CHAVES, I. I., SILVA, M. D. C. M. L., CARDOSO, F. F., and RICARDO, C. P. C. Proteomic analysis of apoplastic fluid of *Coffea arabica* leaves highlights novel biomarkers for resistance against *Hemileia vastatrix*. *Frontiers in plant science*, 6, 478, 2015.

GUERRA-GUIMARÃES, L.; RICARDO, C. P. Mecanismos celulares da resposta da folha de *Coffea arabica* a stress/defesa: análise proteômica do apoplasto. Universidade Federal de Viçosa, Editors: Liliane Evangelista Visôto, pp.322-337, 2015.

GUO, Y. e SONG, Y. Differential proteomic analysis of apoplastic proteins during initial phase of salt stress in rice. *Plant Physiology*. 121–122, 2009.

HARTUNG, W. J., RADIN, W. and HENDRIX, D. L. Absciscic acid movement into the apoplasmic solution of water stressed cotton leaves: Role of apoplastic pH. *Plant Physiol.* 86: 908–913, 1987.

HIRAGA, S., SASAKI, K., ITO, H., OHASHI, Y., & MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42(5), 462-468, 2001.

HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochemical Society Transactions*. Volume 30, part. 6, 2002.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Produção agrícola municipal**. Brasília, DF, 2018. Disponível: www.sidra.ibge.gov.br. Acesso em: 18 de novembro de 2018.

International Cocoa Organization (ICCO). Cocoa Market Review: October, 2018.

ITO, H., HIRAO, N., OHBAYASHI, A., & OHASHI, Y. Purification and characterization of rice peroxidases. *Agricultural and biological chemistry*, 55(10), 2445-2454, 1991.

JASHNI, M. K., MEHRABI, R., COLLEMARE, J., MESARICH, C. H., & De WIT, P. J. The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant–pathogen interactions. *Frontiers in plant science*, 6, 584, 2015.

JORRÍN-NOVO, J. V., VALLEDOR-GONZÁLEZ, L., CASTILLEJO-SÁNCHEZ, M. A., SÁNCHEZ-LUCAS, R., GÓMEZ-GÁLVEZ, I. M., LÓPEZ-HIDALGO, C. & JWA, N. S., & HWANG, B. K. Convergent evolution of pathogen effectors toward reactive oxygen species signaling networks in plants. *Frontiers in plant science*, 8, 1687, 2017.

LEE, S. J., SARAVANAN, R. S., DAMASCENO, C. M., YAMANE, H., KIM, B. D., & ROSE, J. K. Digging deeper into the plant cell wall proteome. *Plant physiology and Biochemistry*, 42(12), 979-988, 2004.

LI, Y. B., HAN, L. B., WANG, H. Y., ZHANG, J., SUN, S. T., FENG, D. Q., YANG, C. L., SUN, Y. D., ZHONG, N. Q. and XIA, G. X. The Thioredoxin GbNRX1 Plays a Crucial Role in Homeostasis of Apoplastic Reactive Oxygen Species in Response to *Verticillium dahliae* Infection in Cotton. *Plant Physiol.* 170(4): 2392–2406, 2016.

LITVINTSEVA, A. P., & HENSON, J. M. Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus. *Applied and environmental microbiology*, 68(3), 1305-1311, 2002.

LIU, D. O. N. G., RAGHOTHAMA, K. G., HASEGAWA, P. M., & BRESSAN, R. A. Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(5), 1888-1892, 1994.

LIU, X., WILLIAMS, C. E., NEMACHECK, J. A., WANG, H., SUBRAMANYAM, S., ZHENG, C., & CHEN, M. S. Reactive oxygen species are involved in plant defense against a gall midge. *Plant physiology*, 152(2), 985-999, 2010.

LOBÃO, D. E., SETENTA, W. C. and VALLE, R. R. Sistema agrossilvicultural cacauero-modelo de agricultura sustentável. *Agrossilvicultura*, 1(2), 163-173, 2004.

LOHAUSA, G., PENNEWISSB, K., SATTELMACHERB, B., HUSSMANNA, M. and MUEHLING, K. Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiologia Plantarum* 111: 457–465, 2001.

LONG, J. M., & WIDDERS, I. E. Quantification of apoplastic potassium content by elution analysis of leaf lamina tissue from pea (*Pisum sativum* L. cv Argenteum). *Plant physiology*, 94(3), 1040-1047, 1990.

MARES, J. H., GRAMACHO, K. P., DOS SANTOS, E. C., DA SILVA SANTIAGO, A., DE ANDRADE SILVA, E. M., ALVIM, F. C., & PIROVANI, C. P. Protein profile and protein interaction network of *Moniliophthora perniciosa* basidiospores. *BMC microbiology*, 16(1), 120, 2016.

MARES, J. H., GRAMACHO, K. P., SANTOS, E. C., da Silva Santiago, A., SANTANA, J. O., de SOUSA, A. O. & Pirovani, C. P. Proteomic analysis during of spore germination of *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease in cacao. *BMC microbiology*, 17(1), 176, 2017.

MARTÍNEZ, A. P., MARTÍNEZ, S. T., & ARDILA, H. D. Condiciones para el análisis electrofórico de proteínas apoplásticas de tallos y raíces de clavel (*Dianthus caryophyllus* L) para estudios proteómicos. *Revista Colombiana de Química*, 46(2), 2017.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, A. P., ARDILA, H. D., MARTÍNEZ-PERALTA, S. T., MELGAREJO-MUÑOZ, L. M., CASTILLEJO-SÁNCHEZ, M. A., & JORRÍN-NOVO, J. V. What proteomic analysis of the apoplast tells us about plant–pathogen interactions. *Plant Pathology*, 67(8), 1647-1668, 2018.

MATERN, U., and KNEUSEL, R. E. Phenolic compounds in plant disease resistance. *Phytoparasitica*, 16, 153-170, 1988.

MEINHARDT, L. *et al.* *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? *Molecular Plant Pathology*, Londres, v. 9, n. 5, p. 577-588, set. 2008.

MELLO, M. O. and SILVA-FILHO, M. C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. vol.14 no.2, Londrina May/Aug., 2002.

MENOSSEI, M., SILVA-FILHO, M. C., VINCENTZ, M., VAN-SLUYS, M. A. and SOUZA, G. M. Sugarcane Functional Genomics: Gene Discovery for Agronomic Trait Development. *Int J Plant Genomics*, 2008.

MIKA, A., MINIBAYEVA, F., BECKETT, R., & LÜTHJE, S. Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2), 173-193, 2004.

MOTAMAYOR, J. C., MOCKAITIS, K., SCHMUTZ, J., HAIMINEN, N., LIVINGSTONE III, D., CORNEJO, O. & SASKI, C. The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. *Genome biology*, 14(6), r53, 2013.

MOTAMAYOR, J. C., RISTERUCCI, A. M., LOPEZ, P. A., ORTIZ, C. F., MORENO, A. and LANAUD, C. Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*. 89:380-386, 2002.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22 (5): 867-880, 1981.

NASSER, W., De TAPIA, M., & BURKARD, G. Maize pathogenesis-related proteins: characterization and cellular distribution of 1, 3- β -glucanases and chitinases induced by brome mosaic virus infection or mercuric chloride treatment. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 36(1), 1-14, 1990.

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

NICHOLSON, R. L., & HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual review of phytopathology*, 30(1), 369-389, 1992.

NOCTOR, G., & FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, 49(1), 249-279, 1998.

NÜRNBERGER, T., BRUNNER, F., KEMMERLING, B., & PIATER, L. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological reviews*, 198(1), 249-266, 2004.

O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal Of Biological Chemistry*. Vol. 250, No. 10, pp. 400-4021, 1975.

OJA, V., SAVCHENKO, G., JAKOB, B., & HEBER, U. pH and buffer capacities of apoplastic and cytoplasmic cell compartments in leaves. *Planta*, 209(2), 239-249, 1999.

OLIVEIRA, M. D., & LUZ, E. D. M. N. Identificação e manejo das principais doenças do cacaueteiro no Brasil. *Ilhéus: CEPLAC/CEPEC/SEFIT*, 2005.

OSBOURN, A. E. Plant mechanisms that give defense against soilborne diseases. *Australas Plant Pathol*, 30, 99–102, 2001.

PECHANOVA, O., HSU, C. Y., ADAMS, J. P., PECHAN, T., VANDERVELDE, L., DRNEVICH, J. & TSCHAPLINSKI, T. J. Apoplast proteome reveals that extracellular matrix contributes to multistress response in poplar. *BMC genomics*, 11(1), 674, 2010.

PEREIRA, A. S., De Almeida, A. A. F., da SILVA, B., M. C., COSTA, M. G. C., & AHNERT, D. Combining ability, heritability and genotypic relations of different physiological traits in cacao hybrids. *PloS one*, 12(6), e0178790, 2017.

PIETERSE, C. M.J., VAN PELT, J. A., VAN WEES, S. C. M., TON, J., VERHAGEN, B. W. M., LÉON-KLOOSTERZIEL, K., HASE, S., DE VOS, M., OOSTEN, V. V., POZO, M., SPOEL, S., VAN DER ENT, S., KOORNNEEF, A., CHALFUN-JUNIOR, A., RESENDE, M. L. V. e VAN LOON, L.C. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. *Revista Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 13, p. 277-295, 2005.

PINTO, M.S.T., RIBEIRO, J. M. e OLIVEIRA, E. A. G. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. *Revista Brasileira de Biociências*. Porto Alegre, v. 9, n. 2, p. 241-248, abr./jun., 2011.

PIROVANI, C. P. *et al.* Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. *Electrophoresis*, v. 29, n. 11, p. 2391–401, 2008.

PIROVANI, C. P. **Identificação e caracterização de proteínas expressas no espaço intercelular de folhas de *Theobroma cacao* na interação com *Moniliophthora perniciosa*.** Universidade Estadual de Campinas - [Tese de Doutorado]. 2008.

PITANNA, B., KRANZ, T. and MÜHLINGA, K. The apoplastic pH and its significance in adaptation to salinity in maize (*Zea mays* L.): Comparison of fluorescence microscopy and pH-sensitive microelectrodes. *Plant Science*. Volume 176, Issue 4, 497-504, April – 2009.

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

PURDY, L. H., & SCHMIDT, R. A. STATUS OF CACAO WITCHES'BROOM: Biology, Epidemiology, and Management. *Annual review of phytopathology*, 34 (1), 573-594, 1996.

QUIRINO, B. F., CANDIDO, E. S., CAMPOS, P. F., FRANCO, O. L., & KRÜGER, R. H. Proteomic approaches to study plant–pathogen interactions. *Phytochemistry*, 71(4), 351-362, 2010.

RAMANJULU, S., KAISER, W. and DIETZ, K. J. Salt and Drought Stress Differentially Affect the Accumulation of Extracellular Proteins in Barley. *Z. Naturforsch.* 54c, 337-347, 1999.

RATHMELL, W. and SEQUEIRA, L. Soluble Peroxidase in Fluid from the Intercellular Spaces of *Tobacco* Leaves. *Plant Physiol.* 53, 317-318, 1974.

REHEM, B.C.; ALMEIDA, A.-A.F.; SANTOS, I.C.; GOMES, F.P.; PIROVANI, C.P.; MANGABEIRA, P.A.O.; CORRÊA, R.X.; YAMADA, M.M.; VALLE, R.R. Photosynthesis, chloroplast ultrastructure, chemical composition and oxidative stress in *Theobroma cacao* hybrids with the lethal gene *Luteus-Pa* mutant. *Photosynthetica*, 49 (1): 127-139, 2011.

ROCHA, L. B. **A região cacaueira da Bahia – dos coronéis à vassoura-de-bruxa: saga, percepção, representação** / Lurdes Bertol Rocha. Ilhéus: Editus. 255p., 2008.

SADAVA, D.- H., GRAIG – ORIAN, H., GORDON, H. – P., K. – HILLIS, William, DAVID, M. **Vida: A Ciência da Biologia** - 8.ed.: Volume 3: Plantas e Animais, 2009.

SAKURAI, N. Dynamic Function and Regulation of Apoplast in the Plant Body. *J. Plant Res.* 111: 133-148, 1998.

SANDALIO, L. M., RODRÍGUEZ-SERRANO, M., ROMERO-PUERTAS, M. C., & LUIS, A. Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules. In *Peroxisomes and their key role in cellular signaling and metabolism* (pp. 231-255). Springer, Dordrecht, 2013.

SATTELMACHER, B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. Institute for Plant Nutrition and Soil Science. *New Phytologist*. 149: 167–192, 2001.

SCARPARI, L. M., MEINHARDT, L. W., MAZZAFERA, P., POMELLA, A. W.V., SCHIAVINATO, M. A., CASCARDO, J. C. M. and PEREIRA, G. A. G. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicios*a. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, n. 413, p. 865–877, 2005.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; SELA-BUURLAGE, M. B.; PONSTEIN, A. S., BRES-VLOEMANS, S. A., MELCHERS, L. S., VAN DEN ELZEN, P. J., & CORNELISSEN, B. J. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and [beta]-1, 3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiology*, 101(3), 857-863, 1993.

SHARMA, P., JHA, A. B., DUBEY, R. S., & PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012, 2012.

SHEPHERD, R.W., BASS, W.T., HOUTZ, R.L., WAGNER, G.J. Phylloplanins of tobacco are defensive proteins deployed on aerial surfaces by short glandular trichomes. *Plant Cell*. 17, 1851–1861, 2005.

SINGER, R. A monographic study of the genera *Crinipellis* and *Chaetocalathus*. *Lilloa*, 8, 1942.

SOARES, N. C., FRANCISCO, R., RICARDO C. P. and JACKSON, P. A. Proteomics of ionically bound and soluble extracellular proteins in *Medicago truncatula* leaves. *Proteomics*. Jun; 7 (12): 2070-82, 2007.

SOUNIGO, O., LACHENAUD, P., BASTIDE, P., CILAS, C., N'GORAN, J. and LANAUD, C. Assessment of the value of doubled haploids as progenitors in cocoa (*Theobroma cacao* L.) breeding. *J Appl Genet*, v.44 (3), p.339-53. 2003.

SPERSCHNEIDER, J., DODDS, P. N., SINGH, K. B., & TAYLOR, J. M. ApoplastP: prediction of effectors and plant proteins in the apoplast using machine learning. *New Phytologist*, 217(4), 1764-1778, 2018.

SPREITZER, R. J., & SALVUCCI, M. E. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annual review of plant biology*, 53(1), 449-475, 2002.

STANGARLIN, J. R., KUHN, O. J., TOLEDO, M. V., PORTZ, R. L., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. e PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. *Scientia Agraria Paranaensis*. V. 10, número 1, p. 18-46, 2011.

STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). *Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular*. Piracicaba: FEALQ p.227-248, 2008.

STINTZI, A., HEITZ, T., PRASAD, V., WIEDEMANN-MERDINOGLU, S., KAUFFMANN, S., GEOFFROY, P. & FRITIG, B. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75(8), 687-706, 1993.

TEIXEIRA, P. J. P. L., De TOLEDO, T., D. P., REIS, O., Do PRADO, P. F. V., Do RIO, M. C. S., FIORIN, G. L. & MIECZKOWSKI, P. High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *The Plant Cell*, tpc-114, 2014.

TEIXEIRA, R. A. Mecanismos de resistência a fitodoenças. (Revisão bibliográfica apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Universidade Federal de Goiás Goiania, 2011).

TORRES, M. A. ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum*, 138(4), 414-429, 2010.

VALENZUELA, B. A. El chocolate, un placer saludable. *Revista Chilena de Nutrición*, v.34, nº 3, Santiago sep., 2007.

VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European journal of plant pathology*, 103(9), 753-765, 1997.

VAN LOON, L. C., & VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and molecular plant pathology*, 55(2), 85-97, 1999.

- VILLELA-DIAS, C., CAMILLO, L. R., DE OLIVEIRA, G. A., SENA, J. A., SANTIAGO, A. S., DE SOUSA, S. T. and COSTA, M. G. Nep1-like protein from *Moniliophthora perniciosa* induces a rapid proteome and metabolome reprogramming in cells of *Nicotiana benthamiana*. *Physiologia plantarum*, 150(1), 1-17, 2014.
- WANG, W., SCALI, M., VIGNANI, R., SPADAFORA, A., SENSI, E., MAZZUCA, S., & CRESTI, M. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis*, 24(14), 2369-2375, 2003.
- WEIRICK, T., SAHU, S. S., MAHALINGAM, R., & KAUNDAL, R. LacSubPred: predicting subtypes of Laccases, an important lignin metabolism-related enzyme class, using in silico approaches. In *BMC bioinformatics* (Vol. 15, No. 11, p. S15). BioMed Central, 2014.
- WICKRAMASURIYA, A. M. and DUNWELL, J. M. Cacao biotechnology: current status and future prospects. *Plant Biotechnology Journal*. Jan.; 16; pp 4–17, 2018.
- WILKINS, M. R., SANCHEZ, J. C., GOOLEY, A. A., APPEL, R. D., HUMPHERY-SMITH, I., HOCHSTRASSER, D. F., & WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 13(1), 19-50, 1996.
- WITZEL, K., SHAHZAD, M., MATROS, A., MOCK, H. P., & MÜHLING, K. H. Comparative evaluation of extraction methods for apoplastic proteins from maize leaves. *Plant Methods*, 7(1), 48, 2011.
- YOUNG, S. A., GUO, A., GUIKEMA, J. A., WHITE, F. F., & LEACH, J. E. Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interactions with *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Plant Physiology*, 107(4), 1333-1341, 1995.
- ZHANG, L., TIAN, L. H., ZHAO, J. F., SONG, Y., ZHANG, C. J., & GUO, Y. Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. *Plant Physiology*, 149(2), 916-928, 2009.