



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

**GLICOSE INDUZ RESISTÊNCIA À *Moniliophthora perniciosa* EM
Theobroma cacao QUANDO APLICADA VIA SEMINAL**

NAYARA DE ALMEIDA SANTOS

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2019

NAYARA DE ALMEIDA SANTOS

**GLICOSE INDUZ RESISTÊNCIA À *Moniliophthora perniciosa* EM
Theobroma cacao QUANDO APLICADA VIA SEMINAL**

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

S237

Santos, Nayara de Almeida.

Glicose induz resistência à *Moniliophthora perniciosa* em *Theobroma cacao* quando aplicada via seminal / Nayara de Almeida Santos. – Ilhéus : UESC, 2019.

88f. : il.

Orientador : Alex-Alan Furtado de Almeida.

Coorientador : Carlos Priminho Pirovani.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui referências.

1. Cacaueiro – Doenças e pragas – Controle. 2. Vassoura-de-bruxa (fitopatologia). 3. Relação planta-patógeno. I. Almeida, Alex-Alan Furtado de. II. Pirovani, Carlos Priminho. III. Título.

CDD – 633.74

Nayara de Almeida Santos

GLICOSE INDUZ RESISTÊNCIA À *Moniliophthora perniciosa* EM *Theobroma cacao*
QUANDO APLICADA VIA SEMINAL

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: 19 de fevereiro de 2019.

Profa. Dra. Milena do Amaral Santos
(UESC)

Profa. Dra. Ivanildes Conceição dos Santos
(UESC)

Profa. Dra. Amanda Ferreira da Silva Mendes
(IFBA)

Prof. Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida
(UESC - orientador)

“Aos meus pais, minhas irmãs e sobrinho”
Dedico

AGRADECIMENTOS

Diante da finalização desse ciclo, de todo o incentivo recebido em todos os momentos durante esses dois anos de caminhada. Só tenho a agradecer a todas as pessoas que se fizeram presentes. Segue os meus agradecimentos.

Agradeço a Deus; pela vida, por tudo que tens me proporcionado, pelas bênçãos concebidas, pela superação de todas as dificuldades encontradas e aos espíritos de luz, pela presença em minha vida.

À minha família, meu alicerce. Meus pais Francisco e Aracilda, por todo apoio, confiança, oração e amor incondicional, às minhas irmãs Cláudia e Kelly, pelo companheirismo e amizade, meu sobrinho e afilhado Rafael, pelo carinho.

Ao meu orientador professor Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida, por toda a orientação, pelos conselhos e ensinamentos. Ao meu Coorientador professor Dr. Carlos Priminho Pirovani, pela Coorientação recebida e ensinamentos.

À D'ávila Maria, Adriadna Souza, Julian Apraez, por toda ajuda durante a realização das análises e o trabalho na bancada, pela paciência. Agradeço imensamente, por todo apoio e por compartilhar comigo seus conhecimentos.

As colegas e amigas do grupo “proteômicos”, pela convivência diária no laboratório, pelos momentos de descontração e pela amizade. Em especial Alda, Ariana, Bruna, Ivina, Leticia, Maria Luiza, Maria Zugaib e Natasha.

Aos colegas da Fisiologia Vegetal, por todo carinho, pela disponibilidade em ajudar nos momentos de dúvidas e desesperos. Especialmente, ao Joédson, Tainã e Natália.

Ao técnico da proteômica Horlei, pessoa admirável que sempre fez questão de ajudar em diversos momentos, seja com uma palavra amiga, um conselho ou uma atividade no laboratório, enfim, agradeço imensamente.

Aos secretários do programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Fabrícia, Mara e Felipe. Uma gratidão a Mara, por sempre compreender os momentos de procura na secretaria, pelos abraços nos momentos de estresses e desânimo.

Aos professores do PPGGBM, por compartilhar seus conhecimentos, pelos conselhos e incentivos, ou seja, pela contribuição na minha formação.

Aos professores e funcionários do Centro de Biotecnologia e Genética (CBG) pela receptividade, em especial a funcionária Dona Jô por todo carinho.

À FAPESB, pela concessão da bolsa, a qual foi indispensável para a continuidade e incentivo a pesquisa.

À FINEP, pelo financiamento do projeto.

À CAPES, pela ajuda financeira por meio do PROAP para a participação e divulgação do trabalho de mestrado no Congresso Internacional de Genética 2018.

A todos minha enorme gratidão!

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento.”

Albert Einstein

ÍNDICE

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. <i>Theobroma cacao</i>	3
2.2. <i>Moniliophthora perniciosa</i>: aspectos gerais	4
2.3. Interação planta – patógeno	6
2.4. Resistência Induzida	8
2.5. Indução de resistência por meio de elicitores químicos	11
2.6. Metabolismo antioxidativo em plantas	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Material vegetal e condições de cultivo	18
3.2. Coleta de material vegetal para análises	19
3.3. Inoculação de <i>Moniliophthora perniciosa</i>	19
3.4. Metabolismo antioxidativo	20
3.4.1. Dismutase do superóxido (SOD)	20
3.4.2. Catalase (CAT)	21
3.4.3. Peroxidase do ascorbato (APX)	21
3.4.4. Peroxidase do guaiacol (GPX)	21
3.5. Análise <i>Western Blot</i>	22
3.5.1. Extração das proteínas	22
3.5.2. Análise de acumulação de proteínas por <i>immunoblotting</i>	23

3.6. Análise proteômica.....	24
3.6.1. Extração de proteínas.....	24
3.6.2. Quantificação de proteínas.....	26
3.6.3. Eletroforese em gel SDS-PAGE.....	26
3.6.4. Primeira dimensão: focalização isoeletrica.....	27
3.6.5. Segunda dimensão: eletroforese em gel de poliacrilamida.....	27
3.6.6. Análise dos géis.....	29
3.6.7. Excisão dos spots e extrações de peptídeos.....	29
3.6.8. Espectrometria de massas (MS/MS)	30
3.6.9. Processamento e anotação das proteínas.....	30
3.7. Análise estatística.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1. Metabolismo antioxidativo.....	32
4.1.1. Dismutase do superóxido (SOD).....	32
4.1.2. Catalase (CAT).....	33
4.1.3. Peroxidase de ascorbato (APX).....	34
4.1.4. Peroxidase de guaiacol (GPX).....	35
4.2. Acúmulo de proteínas por meio do <i>Western Blot</i>.....	36
4.3. Análise proteômica.....	39
4.3.1. Eficácia do perfil proteico das amostras foliares de <i>T. cacao</i> em SDS-Page dos genótipos Catongo e CCN 51.....	39
4.3.2. Perfil proteico dos genótipos de <i>T. cacao</i> Catongo e CCN 51 obtidos por meio da eletroforese bidimensional (2D-PAGE), na presença e ausência de glicose.....	40
4.3.3. Distribuição dos spots proteicos de acordo com a massa molecular (MM) e o ponto isoeletrico (PI) nos genótipos Catongo e CCN 51 na presença e ausência de glicose.....	42
4.3.4. Identificação das proteínas diferencialmente acumuladas dos genótipos Catongo e CCN 51.....	45

4.3.5. Categorização funcional das proteínas de acordo com o <i>gene ontology</i>	51
4.3.6. Gráficos <i>Heat maps</i> das proteínas diferencialmente acumuladas dos genótipos Catongo e CCN 51 de acordo com maior (<i>UP regulation</i>) e menor expressão (<i>Down regulation</i>)	55
5. DISCUSSÃO.....	64
6. CONCLUSÕES.....	72
7. REFERÊNCIAS.....	73

RESUMO

SANTOS, Nayara de Almeida, M.S. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2019. **Glicose induz resistência à *Moniliophthora perniciosa* em *Theobroma cacao* quando aplicada via seminal**. Orientador: Prof. Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida. Coorientador: Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani.

A vassoura de bruxa (VB), que tem como agente causal o fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, é considerada uma das principais doenças do cacau no Brasil, por promover uma queda drástica na sua produção. Uma das alternativas mais eficientes de controle da doença é a utilização de genótipos resistentes pelos cacauicultores. De modo geral, a resistência da planta a um determinado patógeno é definida, sob aspecto genético funcional, como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos, por meio de mecanismos de defesa próprios, inativos ou latentes na planta. Na Resistência Sistêmica Adquirida (RSA), há uma resposta imune das plantas ao ataque de agentes patogênicos. A indução de RSA em plantas constitui uma alternativa promissora para o controle de fitopatógenos. O presente estudo teve como objetivo principal compreender os mecanismos de defesa em *Theobroma cacao* contra *M. perniciosa*, desencadeados pelos elicitores químicos sacarose, glicose e ácido salicílico, fornecidos via seminal, por meio de análises da atividade de enzimas do metabolismo antioxidativo e de *western blot*, e, principalmente, do elicitador glicose por meio de análise do perfil proteômico, em dois genótipos de cacau ('Catongo' e CCN 51) contrastantes para tolerância ao patógeno. No metabolismo antioxidativo ao analisar a atividade da enzima dismutase do superóxido (SOD), o genótipo 'Catongo' apresentou um aumento de sua atividade nos tratamentos infectados com *M. perniciosa* na presença de sacarose, glicose e ácido salicílico, em relação ao controle, infectado com *M. perniciosa* na ausência dos elicitores. Por outro lado, houve uma diminuição da atividade da SOD no genótipo CCN 51, no tratamento infectado com o patógeno na presença dos elicitores químicos, quando comparados ao controle. Para a atividade da catalase (CAT) houve um aumento nos tratamentos infectados com *M. perniciosa* na presença dos elicitores químicos nos genótipos 'Catongo' e CCN 51, quando comparados com o controle. A análise da atividade da peroxidase do ascorbato (APX) mostra incrementos para o genótipo 'Catongo' nos tratamentos infectados com *M. perniciosa* na presença de sacarose e ácido salicílico, em comparação ao controle. No genótipo CCN 51 foi observado aumento da enzima em todos os tratamentos infectados na presença dos elicitores, quando comparados ao tratamento controle. Por outro lado nos genótipos 'Catongo' e CCN 51 houve reduções significativas da enzima peroxidase do guaiacol (GPX) nos tratamentos infectados com *M. perniciosa* na presença dos elicitores químicos comparados ao controle. Essas respostas demonstraram que as plantas apresentam diversos mecanismos de defesa. Ainda assim, a enzima catalase foi identificada em ambos os genótipos contrastantes por meio da técnica *Western Blot*, a qual apresentou maior expressão nos tratamentos infectados com *M. perniciosa* na presença dos elicitores químicos em comparação ao controle (infectado com *M. perniciosa* na ausência dos elicitores (comprovando os resultados apresentados por

meio da dosagem da respectiva enzima. Nessa perspectiva a proteína β *AtpB* sintase, também, apresentou maior concentração em folhas de ambos os genótipos ('Catongo' e CCN 51) infectados com o patógeno na presença dos três elicitores químicos utilizados, em comparação com os seus respectivos controles (infectados com o patógeno na ausência dos elicitores). Ao analisar a proteína foliar Bip nos genótipos em estudo pela técnica do *Western Blot*, verificou-se que o genótipo CCN 51 apresentou maior expressão desta proteína quando infectado com o patógeno e na presença dos elicitores químicos, quando comparado com genótipo Catongo submetido ao mesmo tratamento. Para a análise proteômica detectaram-se, para o genótipo 'Catongo', 66 proteínas diferencialmente acumuladas em ambos os tratamentos, além de 43 proteínas no controle e 177 proteínas detectadas apenas no tratamento elicitado. Em contrapartida, para o genótipo CCN 51, foram detectadas 99 proteínas diferencialmente acumuladas em ambos os tratamentos, 131 proteínas no controle e 120 proteínas detectadas apenas no tratamento com glicose. Ao analisar as proteínas diferencialmente acumuladas, identificaram-se proteínas com atividade metabólica (Biossíntese e catabolismo), atividade fotossintética, oxirredução e com respostas de defesa e estresse em ambos os genótipos. Algumas dessas proteínas estão diretamente relacionadas ao estresse pelo patógeno em plantas. Em relação ao metabolismo antioxidativo observou-se que os elicitores químicos sacarose, glicose e ácido salicílico promoveram um aumento na atividade das enzimas SOD, CAT, APX e GPX, em nível foliar, na presença do patógeno. Ainda assim, os elicitores químicos aumentaram a expressão significativa da enzima catalase e da proteína β *AtpB* sintase nos tratamentos infectados com *M. perniciosa* em ambos os genótipos. Sobre o perfil proteômico foliar o genótipo tolerante ao *M. perniciosa* (CCN 51) apresentou maior expressão de proteínas tanto no controle (infectado com o patógeno na ausência de glicose) quanto no tratamento (infectado com o patógeno e elicitado com glicose) quando comparado com o genótipo intolerante ao *M. perniciosa* ('Catongo'), porém notou-se que, o genótipo 'Catongo' tratado com o elicitor químico glicose, apresentou um aumento de proteínas detectadas durante a interação planta-patógeno, demonstrando que as plantas nesse tratamento apresentou mecanismos de tolerância ao estresse se comparado com o controle (infectado com *M. perniciosa* na ausência de glicose).

Palavras-chave: Cacao; Interação planta-patógeno; Vassoura de Bruxa; Expressão de proteínas;

ABSTRACT

SANTOS, Nayara de Almeida, M.S. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2019. **Glucose induces resistance to *Moniliophthora perniciosa* in *Theobroma cacao* when applied in seeds.** Advisor: Prof. Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida. Co-advisor: Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani.

Witches' broom (WB), which has as its causal agent the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, is considered one of the main diseases of cacao in Brazil, for causing a drastic fall in its production. One of the most efficient alternatives to control the disease is the use of resistant genotypes by the cocoa producers. In general, the resistance of the plant to a specific pathogen is defined, under functional genetic aspects, as the ability of the plant to delay or prevent the entry and subsequent activity of a pathogen in its tissues, through its own defense mechanisms, inactive or latent in the plant. In the Systemic Acquired Resistance (RSA), resistance is an immune response of plants to the attack of pathogens, a systemic protection against invasion of the pathogen. The induction of RSA in plants constitutes a promising alternative for the control of phytopathogens. The main objective of this study was to understand the mechanisms of defense against *M. perniciosa*, triggered by the chemical elicitors sucrose, glucose and salicylic acid, provided by seminal analysis of the activity of enzymes of the antioxidative metabolism and *western blot*, mainly of the glucose elicitor by means of proteomic profile analysis, in two contrasting cacao genotypes ('Catongo' and CCN 51) for tolerance to the pathogen. In the antioxidative metabolism when analyzing the activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD), the 'Catongo' showed an increase in its activity in the treatments infected with *M. perniciosa* in the presence of sucrose, glucose and salicylic acid, in relation to the inoculated control with *M. perniciosa* in the absence of the elicitors. On the other hand, there was a decrease of the SOD activity in the CCN 51, in the treatment infected with the pathogen in the presence of the chemical elicitors, when compared to the control. For catalase activity there was an increase in the treatments infected with *M. perniciosa* in the presence of the chemical elicitors in the 'Catongo' and CCN 51, when compared to the control. The analysis of the APX activity shows increases for the 'Catongo' in the treatments infected with *M. perniciosa* in the presence of sucrose and salicylic acid, in comparison to the control. In the CCN 51, an increase of the enzyme was observed in all treatments infected in the presence of elicitors, when compared to the control treatment. On the other hand, in the genotypes 'Catongo' and CCN 51 there were significant reductions of the GPX enzyme in the treatments infected with *M. perniciosa* in the presence of the chemical elicitors compared to the control. These responses point out those plants have several defense mechanisms. Nevertheless, the catalase enzyme was identified in both contrasting genotypes by means of the *Western Blot* technique, which showed greater expression in the treatments infected with *M. perniciosa* in the presence of the chemical elicitors in comparison to the control (inoculated with *M. perniciosa* in the absence of In this perspective the β protein *AtpB synthase*, also, presented higher concentration in leaves of both genotypes ('Catongo' and CCN 51) infected with the pathogen in the presence of the three elicitors In order to analyze the Bip leaf protein in the genotypes under study by the *Western Blot* technique, it was verified that the CCN 51 showed higher expression of this protein when infected with the pathogen and in the presence of

chemical elicitors, when comparing with 'Catongo' submitted to the same treatment. For the 'Catongo', 66 proteins differentially accumulated in both treatments were detected, as well as 43 proteins in the control and 177 proteins detected only in the elicited treatment. In contrast, for the CCN 51, 99 differentially accumulated proteins were detected in both treatments, 131 proteins in the control and 120 proteins detected only in the glucose treatment. By analyzing the differentially accumulated proteins, proteins with metabolic activity (Biosynthesis and catabolism), photosynthetic activity, oxidation and with defense and stress responses were identified in both genotypes. Some of these proteins are directly related to plant pathogen stress. In relation to the antioxidative metabolism, it was observed that the chemical elicitors sucrose, glucose and salicylic acid promoted an increase in the activity of SOD, CAT, APX and GPX enzymes at leaf level in the presence of the pathogen. Nevertheless, the chemical elicitors increased the significant expression of the enzyme catalase and the β protein *AtpB synthase* in the treatments infected with *M. perniciosus* in both genotypes. On the leaf proteomic profile, the *M. perniciosus* tolerant genotype (CCN 51) presented higher protein expression in both the control (infected with the pathogen in absence of glucose) and in the treatment (infected with the pathogen and elicited with glucose) when compared to the genotype intolerant to *M. perniciosus* ('Catongo'), but it was noticed that the genotype 'Catongo' treated with the chemical elicitor glucose showed an increase of proteins detected during the plant-pathogen interaction, demonstrating that the plants in this treatment presented mechanisms of stress tolerance when compared to the control (infected with *M. perniciosus* in the absence of glucose).

Keywords: Cocoa; Plant-pathogen interaction; Witches' broom; Expression of proteins;

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Atividade de dismutase do superóxido (SOD), em folhas de plantas jovens de dois genótipos de *T. cacao* ('Catongo' - intolerante ■ e CCN 51 - tolerante ■ à vassoura de bruxa) infectados com *M. pernicioso* (controle) e infectados + tratados com diferentes elicitores químicos (sacarose – Sac, glicose – Gli e ácido salicílico - As). As amostras foliares foram coletadas 48 h após a inoculação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas e, ou minúsculas não diferem entre si, dentro e entre genótipos, respectivamente, pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As barras correspondem aos erros padrões das médias..... 33
- Figura 2 -** Atividade de catalase (CAT), em folhas de plantas jovens de dois genótipos de *T. cacao* ('Catongo' - intolerante ■ e CCN 51 - tolerante ■ à vassoura de bruxa) infectados com o *M. pernicioso* (controle) e infectados + tratados com diferentes elicitores químicos (sacarose – Sac, glicose – Gli e ácido salicílico - As) infectados com *M. pernicioso*. As amostras foliares foram coletadas 48 h após a inoculação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas e, ou minúsculas não diferem entre si, dentro e entre genótipos, respectivamente, pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As barras correspondem aos erros padrões das médias..... 34
- Figura 3 -** Atividade da peroxidase do ascorbato (APX), em folhas de plantas jovens de dois genótipos de *T. cacao* ('Catongo' - intolerante ■ e CCN 51 - tolerante ■ à vassoura de bruxa) infectados com o *M. pernicioso* (controle) e infectados + tratados com diferentes elicitores químicos (sacarose – Sac, glicose – Gli e ácido salicílico - As) infectados com *M. pernicioso*. As amostras foliares foram coletadas 48 h após a inoculação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas e, ou minúsculas não diferem entre si, dentro e entre genótipos, respectivamente, pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As barras correspondem aos erros padrões das médias..... 35
- Figura 4 -** Atividade de peroxidase de guaiacol (GPX), em folhas de plantas jovens de dois genótipos de *T. cacao* ('Catongo' - intolerante ■ e CCN 51 - tolerante ■ à vassoura de bruxa) infectados com o *M. pernicioso* (controle) e infectados + tratados com diferentes elicitores químicos (sacarose – Sac, glicose – Gli e ácido salicílico - As). As amostras foliares foram coletadas 48 h após a inoculação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas e, ou minúsculas não diferem entre si, dentro e entre genótipos, respectivamente, pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As barras correspondem aos erros padrões das médias..... 36
- Figura 5 -** (A) Identificação de catalase (CAT) por meio de *Western Blot*. (M) marcador molecular, (1) controle ['Catongo' (Cat)], (2) controle (CCN 51), (3) tratamento infectado com *M.*

perniciosa + sacarose ['Catongo' (Cat)], (4) tratamento infectado com *M. perniciosa* + sacarose (CCN51), (5) tratamento infectado com *M. perniciosa* + glicose ['Catongo' (Cat)], (6) tratamento infectado com *M. perniciosa* + glicose (CCN 51), (7) tratamento infectado com *M. perniciosa* + ácido salicílico ['Catongo' (Cat)] e (8) tratamento infectado com *M. perniciosa* + ácido salicílico (CCN 51). Genótipo de *T. cacao* 'Catongo'■, intolerante ao fungo *M. perniciosa* e genótipo de *T. cacao* CCN 51■, tolerante ao fungo *M. perniciosa* (B) Gel SDS-PAGE. (C) Houve expressão em intensidade de bandas nos tratamentos em relação aos controles..... 37

Figura 6 - (A) Identificação de *AtpB synthase* (53,9 kDa) por meio do *Western blot*. (M) marcador molecular, (1) controle ['Catongo' (Cat)], (2) controle (CCN 51), (3) tratamento infectado com *M. perniciosa* + sacarose ['Catongo' (Cat)], (4) tratamento infectado com *M. perniciosa* + sacarose (CCN51), (5) tratamento infectado com *M. perniciosa* + glicose ['Catongo' (Cat)], (6) tratamento infectado com *M. perniciosa* + glicose (CCN 51), (7) tratamento infectado com *M. perniciosa* + ácido salicílico ['Catongo' (Cat)] e (8) tratamento infectado com *M. perniciosa* + ácido salicílico (CCN 51). Genótipo de *T. cacao* 'Catongo'■, intolerante ao fungo *M. perniciosa* e genótipo de *T. cacao* CCN 51■, tolerante ao fungo *M. perniciosa*. (B) Gel SDS-PAGE. (C) Houve expressão em intensidade de bandas nos tratamentos em relação aos controles..... 38

Figura 7 - (A) Identificação da Proteína de ligação (Bip) por meio do *Western blot*. (M) marcador molecular, (1) controle ['Catongo' (Cat)], (2) controle (CCN 51), (3) tratamento infectado com *M. perniciosa* + sacarose ['Catongo' (Cat)], (4) tratamento infectado com *M. perniciosa* + sacarose (CCN51), (5) tratamento infectado com *M. perniciosa* + glicose ['Catongo' (Cat)], (6) tratamento infectado com *M. perniciosa* + glicose (CCN 51), (7) tratamento infectado com *M. perniciosa* + ácido salicílico ['Catongo' (Cat)] e (8) tratamento infectado com *M. perniciosa* + ácido salicílico (CCN 51). Genótipo de *T. cacao* 'Catongo'■, intolerante ao fungo *M. perniciosa* e genótipo de *T. cacao* CCN 51■, tolerante ao fungo *M. perniciosa*. (B) Gel SDS-PAGE. (C) Houve expressão em intensidade de bandas nos tratamentos em relação aos controles..... 39

Figura 8 - Mini SDS-PAGE (M) marcador molecular, (1) controle, (2) tratamento com sacarose, (3) tratamento com glicose e (4) tratamento com ácido salicílico. (A) genótipo de *T. cacao* CCN 51, tolerante ao fungo *M. perniciosa*, (B) genótipo de *T. cacao* 'Catongo' intolerante ao fungo *M. perniciosa*..... 40

Figura 9 - Perfil proteico de amostras foliares do genótipo de *T. cacao* ('Catongo') em 2D-PAGE. (A) (infectado = controle) e em (B) (infectado + glicose = tratamento). As amostras foram focalizadas em *strips* de 13 cm com pH 3-10 não linear (NL). Os géis foram corados com azul de coomassie coloidal (Neuhoff et al.,1988) 41

Figura 10 -	Perfil proteico de amostras foliares do genótipo de <i>T. cacao</i> CCN 51 em 2D-PAGE. (A) (infectado = controle) e (B) (infectado + glicose = tratamento). As amostras foram focalizadas em <i>strips</i> de 13 cm com pH 3-10 não linear (NL). Os géis foram corados com azul de coomassie coloidal (Neuhoff et al.,1988)	42
Figura 11 -	Diagrama de Venn mostrando o número de <i>spots</i> obtidos de proteínas acumuladas e diferencialmente acumuladas, em folhas de dois genótipos de <i>T. cacao</i> , infectados com <i>M. pernicioso</i> , na ausência e na presença de glicose.....	42
Figura 12 -	Distribuição de <i>spots</i> proteicos detectados nos mapas 2-D, de acordo com a massa molecular (kDa), em folhas de plantas jovens do genótipo de <i>T. cacao</i> 'Catongo', infectadas com <i>M. pernicioso</i> , na ausência ■ e na presença ■ de glicose.....	43
Figura 13 -	Distribuição de <i>spots</i> proteicos detectados nos mapas 2-D, de acordo com a massa molecular (kDa), em folhas de plantas jovens do genótipo de <i>T. cacao</i> CCN 51, infectadas com <i>M. pernicioso</i> , na ausência ■ e na presença ■ de glicose.....	44
Figura 14 -	Distribuição de <i>spots</i> proteicos detectados nos mapas 2-D, de acordo com o ponto isoelétrico, em folhas de plantas jovens do genótipo de <i>T. cacao</i> Catongo, infectadas com <i>M. pernicioso</i> , na ausência ■ e na presença ■ de glicose.....	45
Figura 15 -	Distribuição de <i>spots</i> proteicos detectados nos mapas 2-D, de acordo com o ponto isoelétrico, em folhas de plantas jovens do genótipo de <i>T. cacao</i> CCN 51, infectadas com <i>M. pernicioso</i> , na ausência ■ e na presença ■ de glicose.....	45
Figura 16 -	37 Proteínas diferencialmente acumuladas identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) em folhas de plantas jovens do genótipo de <i>T. cacao</i> Catongo, infectadas com <i>M. pernicioso</i> , na ausência e na presença de glicose, em relação a sua função molecular no processo biológico.....	51
Figura 17 -	37 Proteínas diferencialmente acumuladas identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) em folhas de plantas jovens do genótipo de <i>T. cacao</i> Catongo, infectadas com <i>M. pernicioso</i> , na ausência e na presença de glicose, em relação a localização celular.....	52
Figura 18 -	52 Proteínas diferencialmente acumuladas identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) em folhas de plantas jovens do genótipo de <i>T. cacao</i> CCN 51, infectadas com <i>M. pernicioso</i> , na ausência e na presença de glicose, em relação a sua função molecular no processo biológico.....	53

Figura 19 -	52 Proteínas diferencialmente acumuladas identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) em folhas de plantas jovens do genótipo de <i>T. cacao</i> CCN 51, infectadas com <i>M. pernicioso</i> , na ausência e na presença de glicose, em relação a sua localização celular.....	54
Figura 20 -	Gráfico heat map das proteínas diferencialmente acumuladas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de <i>T. cacao</i> Catongo, infectado com <i>M. pernicioso</i> , na ausência (Infectado) e na presença de glicose (Infec + Gli), relacionadas aos processos metabólicos.....	56
Figura 21 -	Gráfico heat map das proteínas diferencialmente acumuladas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de <i>T. cacao</i> CCN 51, infectado com <i>M. pernicioso</i> , na ausência (Infectado) e na presença de glicose (Infec + Gli), relacionadas aos processos metabólicos.....	57
Figura 22 -	Gráfico <i>heat map</i> das proteínas diferencialmente acumuladas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de <i>T. cacao</i> Catongo, infectado com <i>M. pernicioso</i> , na ausência (Infectado) e na presença de glicose (Infec + Gli), relacionadas aos processos fotossintéticos.....	58
Figura 23 -	Gráfico <i>heat map</i> das proteínas diferencialmente acumuladas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de <i>T. cacao</i> CCN 51, infectado com <i>M. pernicioso</i> , na ausência (Infectado) e na presença de glicose (Infec + Gli), relacionadas aos processos fotossintéticos.....	59
Figura 24 -	Gráfico <i>heat map</i> das proteínas diferencialmente acumuladas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de <i>T. cacao</i> Catongo, infectado com <i>M. pernicioso</i> , na ausência (Infectado) e na presença de glicose (Infec + Gli), relacionadas ao processo de oxidoredução.....	60
Figura 25 -	Gráfico heat map das proteínas diferencialmente acumuladas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de <i>T. cacao</i> CCN 51, infectado com <i>M. pernicioso</i> , na ausência (Infectado) e na presença de glicose (Infec + Gli), relacionadas ao processo de oxidoredução.....	61
Figura 26 -	Gráfico heat map das proteínas diferencialmente acumuladas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de <i>T. cacao</i> Catongo, infectado com <i>M. pernicioso</i> , na ausência (Infectado) e na presença de glicose (Infec + Gli), relacionadas ao processo de resposta de defesa e estresse.....	62
Figura 27 -	Gráfico heat map das proteínas diferencialmente acumuladas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de <i>T. cacao</i> CCN 51, infectado com <i>M. pernicioso</i> , na ausência (Infectado) e na presença de glicose (Infec + Gli), relacionadas ao processo de resposta de defesa e estresse.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Famílias das proteínas relacionadas à patogênese.....	10
Tabela 2 -	Proteínas diferencialmente acumuladas, identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) em folhas de plantas jovens do genótipo de <i>T. cacao</i> 'Catongo', infectados com <i>M. pernicioso</i> , na ausência e na presença de glicose.....	47
Tabela 3 -	Proteínas diferencialmente acumuladas, identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) em folhas de plantas jovens do genótipo de <i>T. cacao</i> CCN 51, infectados com <i>M. pernicioso</i> , na ausência e na presença de glicose.....	49

1. INTRODUÇÃO

Theobroma cacao pertence à família Malvaceae, é uma espécie perene nativa da América do Sul e tem como o centro de diversidade genética as florestas do México, da América Central e das bacias do rio Amazonas e Orinoco. A espécie *T. cacao* é comumente cultivado em regiões de clima tropical, em países como Brasil, Colômbia, México, Peru e nas Ilhas Caribenhas, bem como em países Africanos e asiáticos (PEREIRA et al., 1989; GRAMACHO et al., 1992; SOUNIGO et al., 2003). Os maiores países produtores de *T. cacao* são Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Nigéria e o Brasil (ICCO, 2018). No Brasil, os estados mais produtores são o Pará, Espírito Santo, Rondônia e a região sul da Bahia, a qual se destaca por ser a principal produtora de amêndoas de cacau no Brasil. No entanto, com o surgimento de doenças fúngicas como a podridão parda e a vassoura de bruxa (VB), que têm como agentes causais *Phytophthora* sp e *M. perniciosa*, respectivamente, nos últimos 28 anos, houve uma queda drástica na produção de frutos de *T. cacao*, promovendo uma crise econômica na região cacaueira da Bahia (LIMA, 2016).

O desenvolvimento da doença VB é rápido (WHEELER, 1987), podendo as almofadas florais secar, cair ou permanecer na planta, cujos sintomas também podem ser caracterizados pela formação de vassouras. Na planta infectada a gema reprodutiva é revertida para vegetativa desenvolvendo brotações. Os frutos, provenientes de flores infectadas, apresentam forma modificada (frutos com formato de morango) que morrem prematuramente. Frutos quando infectados ainda jovens (bilros, 1 cm de comprimento) crescem no formato de cenoura, secando e apodrecendo posteriormente. Os frutos provenientes de flores normais são susceptíveis entre 8 a 12 semanas após a polinização e, sob alto nível de infecção, apresentam manchas amarelas ou escuras no seu interior, em ambos os casos, apodrecidos ou endurecidos e petrificados. Nos frutos mais desenvolvidos (8 cm de comprimento) pode aparecer manchas escuras, as amêndoas permanecem duras e irregulares ficando unidas entre si, portanto, inaproveitáveis para consumo (TOVAR, 1991).

Estratégias de controles de VB como o manejo e a poda fitossanitária (consiste na retirada das partes infectadas da planta) e os controles químico e biológico (principalmente por meio de fungos endofíticos) são adotadas com a finalidade de

diminuir a incidência da doença (MEJÍA et. al, 2008). No entanto, esses métodos ainda não apresentam eficácia no controle das partes afetadas. Desta forma, a eficiente recuperação da lavoura cacaueira, consiste na substituição de genótipos intolerantes por tolerantes (resistentes) ao patógeno e que sejam produtivos, desenvolvidos em programas de melhoramento genético do cacaueiro. Existe ainda a indução de resistência por meio de elicitores químicos, os quais são métodos considerados como solução econômica e ambiental viável para a utilização, associados a controles biológicos e químicos (LIMA, 2016).

Podem ocorrer divergências quando se comparam espécies ou variedades de plantas. Logo, para relacionar diferentes sistemas e comparar as condições naturais, deve-se considerar a concentração do elicitador, o método de aplicação, a espécie da planta hospedeira e o estágio de crescimento da mesma (HEIL et al., 2000). Apesar de os estudos sobre a interação planta-patógeno e os mecanismos de resistência das plantas se moverem rapidamente, há ainda grandes questões a serem reveladas e pouco conhecimento a respeito da evolução das respostas de defesa da planta e da co-evolução de seus patógenos, principalmente do ponto de vista molecular.

O presente estudo teve como objetivo principal compreender os mecanismos de defesa de *T. cacao* contra *M. pernicioso*, desencadeados pelos elicitores químicos sacarose, glicose e ácido salicílico, fornecidos via seminal, por meio de análises da atividade de enzimas do metabolismo antioxidativo e de *western blot*, e, principalmente, do elicitador glicose por meio de análise do perfil proteômico, em dois genótipos de cacau ('Catongo' e CCN 51) contrastantes para tolerância ao patógeno. Além disso, teve como objetivos específicos (i) analisar o metabolismo antioxidativo envolvido nas respostas de defesa, ativado pelo uso dos elicitores químicos em extratos foliares; (ii) identificar proteínas diferencialmente acumuladas relacionadas ao processo de defesa da planta contra patogenicidade, por meio de análises proteômicas; e (iii) detectar, por meio da técnica do *Western Blot*, proteínas que desempenham funções específicas nas plantas contra o estresse biótico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Theobroma cacao*

A espécie *T. cacao* conhecida popularmente como cacau, é uma planta lenhosa típica de clima tropical, diplóide ($2n = 20$) e alógama (FIGUEIRA et al., 1994; MONTEIRO; AHNERT, 2012), pertencente à família Malvaceae. O gênero *Theobroma* possui 22 espécies, originou-se há milhões de anos na América do Sul, porém as únicas espécies que se destacam por serem exploradas comercialmente no Brasil são *T. cacao* e *T. grandiflorum*. A espécie *T. cacao* se originou nas florestas do México, da América Central e das bacias do rio Amazonas e Orinoco. Os grupos mais cultivados são o Criollo, Forasteiro e Trinitario, os quais se diferenciam pela morfologia, genética e origem geográfica. O Forasteiro é o genótipo mais produzido mundialmente, visto que apresenta características importantes na produção e cultivo, pois é resistente a doenças e bastante produtivo (ICCO, 2018).

A espécie *T. cacao* é considerada uma das culturas perenes mais importantes do mundo (ICCO, 2018) se desenvolvendo em sub-bosque de regiões tropicais (ALMEIDA; VALLE, 2007; OYEKALE et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2015; SCHROTH et al., 2016). Sua grande importância econômica se deve, principalmente, à produção de frutos, dos quais se extraem sementes, cuja polpa é utilizada, principalmente, para fabricação de sucos e sorvetes e as amêndoas (sementes fermentadas) servem de matéria prima para a fabricação de licor, chocolate, cosméticos, dentre outros produtos (FIGUEIRA et al., 1994; ALMEIDA; VALLE, 2007, 2009). Os principais países produtores de *T. cacao* são Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Nigéria e o Brasil, o qual ocupa a quinta posição no ranking dos maiores produtores mundiais, com 210 toneladas por safra (ICCO, 2018). A produção de *T. cacao* no Brasil ocorre em seis estados, sendo o sul do estado da Bahia a principal região produtora de amêndoas de cacau, seguida do estado do Pará.

Com o surgimento de doenças fúngicas na região sul da Bahia, como podridão parda, causada pelo *Phytophthora* sp, e, principalmente, a vassoura de bruxa (VB), que tem como agente causal *M. pernicioso*, nos últimos 29 anos, promoveu uma redução da produção e qualidade do fruto de *T. cacao*, resultando uma crise econômica na região, afetando não só o estado da Bahia como também a produção brasileira de cacau (RIBEIRO et al., 2016).

2.2. *Moniliophthora perniciosa*: aspectos gerais

A doença VB, causada pelo fungo basidiomiceto *M. perniciosa*, pertencente a ordem dos agaricales, família Tricholomataceae, consiste uma importante enfermidade de *T. cacao*, e foi encontrada no sul da Bahia em 1989. Esta enfermidade, considerada umas das mais relevantes da América do sul, nativa da região Amazônica (PEREIRA et al., 1989), afeta os tecidos meristemáticos em crescimento, tais como brotos vegetativos, almofadas florais e frutos de *T. cacao*, com sintomas característicos, resultantes do desequilíbrio hormonal presente na interação planta-patógeno (SILVA et al., 2007). O fungo *M. perniciosa* é um organismo hemibiotrófico, pois apresenta duas fases no seu ciclo de vida: a biotrófica (parasítica) e a necrotrófica (saprofítica). Como sintoma característico da doença, observa-se a formação dos brotos hipertrofiados, desenvolvimento excessivo nas regiões terminais da planta, aparecimento de inúmeras ramificações com entrenós curtos e folhas geralmente grandes, curvadas ou retorcidas, aparentando vassouras. A disseminação do fungo ocorre pela dispersão dos basidiósporos pelo vento, água e material vegetativo contaminado, os quais, para se propagarem, necessitam ser depositado rapidamente sobre os locais (sítios de infecção) do hospedeiro (ROCHA; WHEELER, 1985).

O ciclo da doença começa quando os basidiósporos germinam na superfície de plantas de *T. cacao* e os tubos germinativos penetram nos tecidos jovens diretamente, via estômatos (ANDERBRHAN, 1998) e, ou através das cutículas e dos tricomas (WHEELER, 1996). O processo de germinação dos basidiósporos e penetração ocorre de 4 h às 6 h, respectivamente, após a inoculação do patógeno. Seguido o período de infecção, *M. perniciosa* interfere no metabolismo do hospedeiro, aumentando a quantidade de nutrientes no local infectado (TEIXEIRA, 2015). Durante o início de sua fase de infecção, o micélio se desenvolve como hifas monocarióticas, ou seja, não apresentam grampos de conexão, de crescimento intercelular, fase que ocorre no apoplasto da planta. Após a fase de incubação, há o desenvolvimento do micélio como hifas dicarióticas, formando grampos de conexão. Nesta fase, as vassouras verdes passam pelo período de necrose e morrem, dando origem as “vassouras secas”. Essas vassouras, após o período das chuvas e secas alternadas, produzem novos basidiomas, finalizando o ciclo de vida do fungo (TEIXEIRA, 2015).

A infecção da gema apical do caule promove o desequilíbrio hormonal na planta e uma quebra parcial da dominância apical, promovendo o aparecimento de novos brotos, que se originam de gemas axilares em extremidades das plantas jovens ou nos ramos de plantas adultas, causando a hipertrofia e hiperplasia dos tecidos infectados (RIBEIRO et al., 2016). Sobre as almofadas florais, ao serem infectadas pelo fungo *M. pernicioso*, há o aparecimento de vassouras verdes, flores apresentando anormalidades e frutos partenocárpicos, apresentando características morfológicas parecidas com “morangos” (RIBEIRO et al., 2016). A presença do agente causador de VB em frutos muito jovens (bilros) promove o alongamento do mesmo, aparentando um formato de “cenoura”, ao passo que em frutos jovens promove o amarelamento precoce, escurecimento da casca, cujas amêndoas, juntamente com a polpa, se apresentam com características modificadas e com uma consistência rígida (TOVAR, 1991). Em estados mais avançados da doença, e em condições de alta umidade, surgem esporocarpos (cogumelos) na superfície do local infectado (OLIVEIRA; LUZ, 2012).

Os métodos para o controle de VB incluem controle químico, manejo e poda fitossanitária, controle biológico e utilização de genótipos de *T. cacao* resistentes. O controle químico com fungicidas não protege os tecidos em crescimento ativo, para sua eficácia se faz necessário à realização de muitas pulverizações anuais (PURDY; SCHMIDT, 1996). Além disso, o uso de fungicidas sintéticos de amplo espectro no manejo de doenças de plantas resulta em desequilíbrios na comunidade microbiana e na evolução contínua de múltiplas cepas resistentes (ALAGARASAN et al., 2017). O manejo fitossanitário é realizado em todos os países produtores de *T. cacao* afetados pela VB, consistindo na remoção das vassouras secas no período de seca; com o objetivo de reduzir o inóculo produzido no período chuvoso, diminuindo, assim, a incidência da doença no próximo ciclo produtivo da cultura (PURDY; SCHMIDT, 1996). Por outro lado, tem como fator limitante o custo elevado da mão-de-obra e a necessidade de ser realizada anualmente e, no mínimo, quatro vezes ao ano, dificultando a adoção por todos os produtores (ALBUQUERQUE et al., 1995). Já o controle biológico se fundamenta na utilização de fungos saprofíticos, os quais competem com *M. pernicioso* pela colonização das vassouras secas, impedindo o desenvolvimento deste e a liberação dos basidiocarpos (RIBEIRO et al., 2016).

2.3. Interação planta – patógeno

Na natureza as plantas estão, a todo instante, sofrendo estresses bióticos, provenientes de ataques de patógenos, causando inúmeros problemas com seu desenvolvimento e, principalmente, afetando a produção de diversas culturas. Como forma de se defender contra a patogenicidade, as plantas desenvolvem uma completa rede de defesa contra agentes invasores (CAVALCANTE et al., 2013). Apresentam como estratégias de defesa préformados, a própria membrana vegetal, as papilas, as caloses, a lignificação da parede celular, a camada de abscisão, as camadas de cortiça, os estômatos, entre outros.

Por outro lado, os fungos patogênicos utilizam vários fatores de patogenicidade/virulência para infectar seus hospedeiros (PANDEY et al., 2019). São geralmente classificadas como toxinas eficazes contra as defesas do hospedeiro, partes da maquinaria de transdução de sinal, efetores de penetração e enzimas envolvidas na degradação das defesas do hospedeiro (YODER et al., 2001), conhecidas como enzimas hidrolíticas, que são necessárias para a patogênese fúngica, dentre elas estão as proteases e hidrolases, essenciais para o crescimento e sobrevivência do patógeno (PANDEY et al., 2019). Após o encontro com uma planta hospedeira específica, os fungos fitopatogênicos produzem uma grande quantidade dessas enzimas envolvidas na degradação da parede celular, facilitando assim sua penetração nos tecidos do hospedeiro (KUBICEK et al., 2014). Quando os invasores conseguem penetrar as células dos vegetais, outros mecanismos são ativados, como a alta produção de fenóis, alcalóides, fitotoxinas, glicosídeos cianogênicos, glicosídeos fenólicos, proteínas relacionadas à patogênese (PRP's), entre outros (STAHL; BISHOP, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2017).

O processo de defesa acontece principalmente quando a planta reconhece o invasor por meio de sinais que são ativados por toda a planta, ou seja, fatores de reconhecimento genético presente no hospedeiro e no invasor, sendo que são importantes no processo de interação planta-patógeno. Desta forma, quando o invasor entra em contato com o tecido do hospedeiro e há o reconhecimento do ataque, os genes de defesa (*R*) presentes no hospedeiro são ativados. Neste caso, ocorre uma interação incompatível, ou seja, a planta consegue detectar uma ameaça por meio de estruturas presentes em seus tecidos, em que sinais químicos, provenientes do patógeno, promovem respostas bioquímicas e mudanças

fisiológicas nas plantas, impedindo sua colonização. Quando não há essa percepção de sinais, há a ativação dos genes de avirulência (*Avr*) do invasor e essa interação é compatível, ou seja, o patógeno consegue penetrar nos tecidos da planta e estabelecer sua colonização, provocando sintomas da infecção (ZHANG et al., 2013).

Em decorrência do processo de ligação desses genes, acontece uma cascata de sinalizações por toda a planta, produzindo diversas respostas de defesas. Nas plantas os produtos resultantes dos genes *R* são extremamente polimórficos, lhe possibilitando atuar como receptores de proteínas *Avr* produzidas por diferentes patógenos (HEATH, 2000; THAKUR; SOHAL, 2012). Entretanto, a ativação do sistema imune da planta inclui duas etapas importantes (ZHANG et al., 2013). A primeira etapa é chamada de imunidade desencadeada pela percepção de padrões moleculares associados ao patógeno ou PAMPs (PTI), em resposta a infecção microbiana (ALAGARASAN et al., 2017). Esta, por sua vez, é ativada por meio do reconhecimento de indutores, em que células presentes no hospedeiro conseguem reconhecer moléculas provenientes do invasor (PAMPs), ou moléculas das células do hospedeiro, resultantes da degradação da parede celular, podem interagir por meio da interação com o patógeno, os chamados padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (BOLLER; FELIX, 2009). PAMPs são comuns em patógenos, não-patógenos e saprófitas (JEWORUTZKI et al., 2010; THOMMA et al., 2011; DE FREITAS e STADNIK, 2012; VIDHYASEKARAN, 2014)

A percepção de PAMPs e DAMPs acontece por meio de receptores de reconhecimento padrões (PRRs), presentes na superfície da célula (BOLLER; FELIX 2009, ZHANG et al., 2013), que promovem uma cascata de transdução de sinais ativando a resposta de defesa (Hogenhout et al., 2009). A outra etapa, chamada *effector-triggered immunity* (ETI), acontece por meio da imunidade das plantas, a qual é desencadeada por efetores, em que há o reconhecimento das plantas, mediante receptores adicionais (proteínas *R*) dos efetores produzidos pelo patógeno, que conseguiram evadir do PTI (*PAMP-triggered immunity*) (ZHANG et al., 2013), sendo liberadas dentro da célula vegetal ou na sua matriz extracelular (BIGEARD et al., 2015).

Durante o reconhecimento de um PAMP ou efector, o sistema imune das plantas é ativado por meio de sinalizações, que se baseiam na mudança nos níveis de cálcio no citoplasma, produção de espécies reativas de oxigênio e uma cascata

de sinalização via MAP-quinases (*mitogen activated protein kinases*) (ZHANG et al., 2013). O aumento desses sinais nas células ocorre por meio de hormônios reguladores como ácido salicílico, ácido jasmônico e o etileno, promovendo a ativação de fatores de transcrição, genes de defesa, proteínas relacionadas a patogêneses (PRs), fitoalexinas, lignificação de tecidos, deposição de calose dentre outras defesas da parede celular (Grant & Lamb, 2006). A interação dessas moléculas, seu funcionamento e ligações são pontos chaves para desenvolver a resistência da planta contra o hospedeiro ou a progressão da doença (CURSINO-SANTOS, 2003).

2.4. Resistência Induzida

A resistência da planta a um determinado patógeno é definida, sob aspecto genético funcional, como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos, por meio de mecanismos de defesa próprios, inativos ou latentes na planta (STICHER et al., 1997; ATHAYDE SOBRINHO et al., 2005; NOJOSA et al., 2005). Vários agentes podem induzir a produção de “sinais” no tecido vegetal, disparando reações que ativam os mecanismos de defesa (STICHER et al., 1997). O estado de resistência nas plantas contra doenças pode ser induzido sistemicamente pela utilização de agentes externos (indutores) bióticos ou abióticos, sem qualquer alteração no genoma da planta. Esse processo ocorre de maneira não-específica, por meio da ativação de diferentes vias sinalizadoras de respostas de defesa, as quais podem ser mediadas especialmente por alguns elicitores químicos, seja o ácido salicílico (PIETERSE et al., 1998), ácido jasmônico e/ou etileno (RESENDE et al., 2007).

A resistência induzida (RI) é ativada em plantas quando moléculas do indutor se ligam a moléculas receptoras situadas na membrana plasmática da célula vegetal, desencadeando a ativação de vários mecanismos de defesa (RESENDE et al., 2002). Dessa maneira, o agente externo pode induzir mudanças drásticas na atividade metabólica oxidativa das células ao redor do sítio de invasão, levando a produção de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*, ROS), que ativam os genes de defesa e aumento da produção de metabólitos antimicrobianos (MAC MILLAN, 2002). Este mecanismo, conhecido como reação de hipersensibilidade (RH), é caracterizado por uma rápida morte celular no local da

infecção (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996; DURRANT; DONG, 2004). Após a infecção, ocorre como mecanismos adicionais da planta em respostas a defesa contra o patógeno, a produção de fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (PRP's), e lignificação das paredes celulares.

A resistência induzida é, geralmente, classificada em duas categorias, a resistência sistêmica adquirida (RSA) e a resistência sistêmica induzida (RSI) (VAN LOON et al., 1998), sendo fenômenos distintos (STICHER, et al., 1997). Na RSA, a resistência é uma resposta imune das plantas ao ataque de patógenos (LUNA, et al., 2012; SHAH et al., 2014), uma proteção sistêmica contra invasão do patógeno (CHEOL SONG et al., 2016). Esta resistência é induzida após uma infecção local e confere imunidade em toda a planta (PUSZTAHELYI et al., 2015), causando uma lesão necrótica (HR), em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos. RSA pode ser induzida pela aplicação exógena de ácido salicílico (acibenzolar-S-metil - ASM) e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA). RSA ocorre por meio de interações compatíveis e incompatíveis, promovendo o aparecimento de lesões necróticas, a qual se percebe uma resistência localizada. Além disso, nas células vizinhas às lesões necróticas são induzidas, no reforço das paredes celulares via lignificação, deposição de calose e formações de papilas (STICHER et al., 1997).

Na RSA, a resistência expressa, geralmente, é efetiva contra um amplo espectro de patógenos, e está associada à produção e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PRP's) (CABELO et al., 1994; IURKIV et al., 2006). Há produção e acúmulo de proteínas ricas em hidroxiprolina, como também a síntese de fenilpropanóides, produtos do metabolismo secundário, como fitoalexinas e compostos fenólicos, síntese de ácido salicílico, e ativação de enzimas chaves como as peroxidases e a fenilalanina amônia-liase (PAL) (LEE et al., 1995; DURRANT; DONG, 2004; CAVALCANTI et al., 2005). A ocorrência da RSA implica, também, na produção de um sinal liberado a partir do sítio inicial de penetração do patógeno ou do local de aplicação do indutor. Posteriormente, há translocação deste sinal para outras partes da planta, ativando reações de defesa e impedindo, uma posterior infecção do patógeno (MÉTRAUX, 2001).

Já na RSI, não há acúmulo de proteínas PRP's, a planta que sofreu indução não apresenta alterações e o agente indutor não é patogênico, geralmente é induzida por rizobactérias. O processo de sinalização está associado a jasmonatos e etileno que, assim como o ácido salicílico, potencializam as respostas dependentes

de ROS (GLAZEBOOK, 2005). O indutor não provoca sintomas, como necrose no local da infecção, mas induz a planta a se proteger sistemicamente (VAN LOON et al., 1998; PIETERSE et al., 1998).

O aumento da expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PRP's), um dos mecanismos induzidos de defesa pela RSA (WARD et al., 1991), é um dos pontos chaves de entendimento deste mecanismo (LABANCA, 2002). As PRP's foram descritas pela primeira vez em 1970 por Van Loon, que observou o acúmulo de proteínas incomuns após infecção de plantas de *Nicotiana tabacum* com o vírus mosaico do fumo (DURRANT; DONG, 2004). Estas proteínas foram inicialmente definidas como proteínas ácidas, de baixo peso molecular, resistentes a proteases e solúveis em ácidos, localizadas nos espaços intra e extracelulares (STICHER et al., 1997) sob condições patológicas. As PRP's presentes nos vacúolos exercem efeito de defesa após a descompartimentalização das células, enquanto que as extracelulares atuam diretamente em contato com o patógeno no processo de penetração do tecido (STICHER et al., 1997).

A concentração e a síntese de PRP's possuem caráter de resposta ativa e sistêmica, em casos de mecanismos induzidos por eliciadores (VAN LOON, 1985; SCHWEIZER, et al., 2000). Considera-se que o acúmulo de PRP's em plantas tem sido observado não apenas após o ataque de patógenos ou parasitas, como nematóides ou insetos (fitófagos ou herbívoros), como também em resposta ao tratamento com compostos químicos indutores de resistência (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999; AMARAL, 2005; SILVA et al., 2007).

Tabela 1: Famílias das proteínas relacionadas à patogênese.

Família	Propriedade
PR-1	Possível ação contra oomicetos
PR-2	β -1,3-Glucanase
PR-3	Quitinase tipo I, II, IV, V, VI e VII
PR-4	Quitinase tipo I e II
PR-5	Proteína semelhante à taumatina
PR-6	Inibidor da proteinase
PR-7	Endoproteinase
PR-8	Quitinase tipo III

PR-9	Peroxidase
PR-10	Proteína semelhante à ribonuclease
PR-11	Quitinase tipo I
PR-12	Defensina
PR-13	Tionina
PR-14	Proteína de transferência de lipídios
PR-15	Oxidase do oxalato
PR-16	Proteína semelhante a oxidase do oxalato
PR-17	Metaloproteinase

(Adaptado de VAN LOON, 2006)

As PRP's possuem um peptídeo-sinal na região N-terminal, responsável pela sua translocação através da membrana do retículo endoplasmático para o vacúolo ou para o espaço intercelular (BOL et al., 1990). São classificadas em 17 famílias distintas, baseando-se na similaridade das seqüências de aminoácidos, relação sorológica ou atividade enzimática ou biológica (GUZZO, 2004). As quitinases e as β -1,3 glucanases são as PRP's mais estudadas (LABANCA, 2002). Ambas possuem atividade hidrolítica, quebrando polímeros estruturais presentes na parede dos patógenos (WALTON, 1997; ANDREU et al., 1998). Além disso, o seqüenciamento de bibliotecas de interação *M. pernicioso* – *T. cacao* (GESTEIRA et al., 2007) permitiu a identificação de seqüências homólogas, em genes de *T. cacao*, associadas a PRP's já conhecidas em outras espécies vegetais (SAWADA et al., 2004; DIAS et al., 2006).

2.5. Indução de resistência por meio de elicitores químicos

As plantas possuem uma maquinaria de defesa contra microrganismos patogênicos. O reconhecimento desses agentes patogênicos ativa uma cascata de sinalização [reconhecimento do patógeno, transdução de sinal externo (elicitador), mensageiros secundários, além da expressão de genes de defesa] nas plantas (EBEL; COSIO, 1994; NÜRNBERGER, 1999). Essas respostas celulares impedem a penetração ou colonização dos patógenos em seus tecidos. As defesas vegetais induzidas podem ser desencadeadas pela aplicação de substâncias químicas que promovem resistência ao ataque de herbívoros ou patógenos (XIN et al., 2012;

BEKTAS; EULGEM, 2015). Essas substâncias químicas são chamadas de elicitores químicos (ZHOU et al., 2018) e são consideradas moléculas extrínsecas que agem em concentrações muito baixas e induzem respostas de defesa da planta (SAMOTA et al., 2017).

A resistência ocorre quando há a transdução de sinais externos (elicitores químicos), que, ao se ligar em receptores presentes nas células dos tecidos vegetais, permite a transmissão de sinais primários para o interior das células, os quais ativam sinais secundários (SAMOTA et al., 2017), regulando a expressão de genes específicos de defesas. As respostas celulares de defesas podem ocorrer por meio da elicitação de compostos bióticos presentes em (i) extratos vegetais (STANGARLIN, et al., 1999), (ii) preparações de leveduras (STADNIK; BETTIOL, 2000), (iii) exopolissacarídeos bacterianos (CASTRO; BACH, 2004), (iv) rizobactérias promotoras de crescimento (VISWANATHAN; SAMIYAPPAN, 2002), (v) fungos promotores de crescimento (MADI; KATAN, 1998), além do próprio patógeno inativado pelo calor (BACH et al., 2003). Entretanto, podem também ser utilizados elicitores abióticos como Bismertiazol (ZHOU et al., 2018), ácido hexanóico (DJAMITCHATCHOU et al., 2017), silício (Si) (CHÉRIF et al., 1994), ácido salicílico (AS) (CIPOLLINI, 2002; VIEIRA; VALLE, 2006; RIBEIRO et al., 2015; LIMA et al., 2016; MANIVANNAN et al., 2016; SAMOTA et al., 2017), sacarose e glicose (RIBEIRO et al., 2015; VIEIRA; VALLE, 2006; LIMA et al., 2016) ácido D-L-aminobutírico (BABA) (ZIMMERLI et al., 2000), quitosana (SATHIYABAMA; BALASUBRAMANIAN, 1998), paclobutrazol (PB) (SAMOTA et al., 2017), cloreto férrico, fosfato de potássio dibásico (BÉCOT et al., 2000), acibenzolar-smetil (ASM) e ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) (BESSER et al., 2000), fosfato de potássio monobásico (REUVENI et al., 2000), ácido jasmônico (AJ) (BALDWIN, 1998; CIPOLLINI, 2002), metil jasmonato (MeJa) (HEIJARI et al., 2005; LUNDBORG et al., 2016; MANIVANNAN et al., 2016; SELDAL et al., 2017), sacarina (BOYLE; WALTRERS, 2005) e ácidos graxos (COQUOZ et al., 1995).

Os elicitores abióticos, frequentemente isolados e identificados, pertencem às classes químicas diferentes, como carboidratos, peptídeos, proteínas, lipídeos, glicoproteínas, glicopeptídeos, ácidos graxos, entre outros (NÜRNBERGER; BRUNNER, 2002; WALTERS et al., 2005). Pesquisas realizadas com diferentes cultivos, incluindo o de *T. cacao*, confirmam o efeito indutor de diversos nutrientes ou micronutrientes no aumento de resistência a doenças, os quais podem atuar como

cofatores de enzimas envolvidas na síntese de compostos fenólicos, como acontece com Mn (SILVA et al., 2008), com o Si (PINTO et al., 2014).

Os compostos sintéticos, como o acibenzolar-S-metil (ASM), e produtos à base de mananoligossacarídeo fosforilado (Agro-Mos®), tem se mostrado efetivos na indução de respostas de defesa contra patógenos em *T. cacao* (CAVALCANTI et al., 2008; SILVA et al., 2008; CAMILO, 2009; COSTA et al., 2010). O ASM foi testado com eficácia contra várias doenças em *T. cacao*, incluindo VB, onde reduziu em 60,2% a incidência da doença em mudas do genótipo Catongo, quando pulverizado 15 dias antes da inoculação de *M. perniciosa* (RESENDE et al., 2000). Em estudos semelhantes, plantas pulverizadas com ASM tiveram um aumento na atividade de proteínas relacionadas à patogênese (quitinase e β -1,3-glucanase), induzindo maiores atividades de peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase em mudas de *T. cacao* (RESENDE et al., 2002; 2007). Em plantas tratadas com ASM e Agro-Mos®, observou-se aumento das atividades de quitinases, β -1,3-glucanases, peroxidases do guaiacol e oxidases de polifenóis, sem alteração do conteúdo de lignina e fenóis solúveis totais (COSTA et al., 2010). A redução da incidência da doença propiciada pelo Agro-Mos®, associada com a ativação de enzimas relacionadas às respostas de defesa da planta, sugere que o AgroMos® possui efeito de proteção e indução de resistência contra VB em mudas de *T. cacao* (CAMILO, 2009; COSTA et al., 2010).

Estudos realizados com plantas de *T. cacao* tratadas com cloreto de potássio, glicose, sacarose e ácido salicílico demonstraram ação efetiva na indução à resistência a *M. perniciosa* (VIEIRA; VALLE, 2006; RIBEIRO et al., 2016). Fisiologicamente, a utilização de elicitores químicos, com a finalidade de indução de resistência, podem apresentar efeitos negativos no desenvolvimento das plantas e na sua produção, quando não estão infectadas (HEIL et al., 2000). As plantas possuem alocação de recursos de defesa contra patógenos que são divididas entre defesas constitutivas e induzíveis (COLEY et al., 1985). Com o passar do tempo, as plantas desenvolvem um sistema de defesa latente, com o intuito de economizar energia e substrato, que são ativadas com a presença do patógeno (COLEY et al., 1985). Por outro lado, no caso da resistência constitutiva, que evidencia um custo efetivo à planta, pois independente da presença do patógeno, a planta investe seus recursos no processo de defesa (COLEY et al., 1985). Conforme a hipótese de alocação de recursos, espera-se que, quando os patógenos estão presentes nos

vegetais, o investimento de defesa deve ser eficiente e as plantas induzidas serem beneficiadas (COLEY et al., 1985). Como consequência, a resistência induzida em condições naturais representa um custo apenas na presença do patógeno (HEIL; BALDWIN, 2002), e, mesmo com o surgimento deste, há uma compensação pelo atraso temporal na expressão de defesa, destinando recursos para este propósito somente quando necessário (BOSTOCK, 2005).

As plantas são expostas a diferentes variações ambientais, em condições naturais, *in loco*, as quais são submetidas a se adaptarem por meio de alterações nas atividades transcricionais de diversos genes (SUZUKI et al., 2006). Visto isso, ao comparar espécies ou variedades de plantas em relação ao seu sistema de defesa, pode haver divergências ao comparar diferentes sistemas. Logo, deve-se considerar a concentração do elicitor, o método de aplicação, a espécie vegetal hospedeira e o estágio de crescimento da mesma (HEIL et al., 2000).

Em sementes, o desempenho de substâncias indutoras pode variar entre as espécies vegetais. A eficácia de tratamentos nas sementes, tendo em vista controle de doenças, depende do tipo e localização do patógeno, do vigor da semente e da disponibilidade de substâncias e processos adequados (MENTEN; MORAES, 2010). Estudos realizados com sementes de *Cucumis melo*, tratadas com ASM, foram favoráveis para a indução a resistência a podridão gomosa e ao mofo-branco causado pelos fungos *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, respectivamente (BUZI et al., 2004). As pesquisas salientaram que a aplicação do ASM, em sementes de *Cucumis melo*, ativou diversas vias metabólicas, não só aquelas referentes aos ácidos salicílico e jasmônico, conduzindo ao aumento da resistência contra patógenos distintos (BUZI et al., 2004). No entanto, pesquisas com indução de resistência a VB, em sementes de *T. cacao*, por elicitores químicos, ainda não foram realizadas.

2.6. Metabolismo antioxidativo em plantas

Devido a constante exposição aos estresses bióticos e abióticos as plantas limitam o seu desenvolvimento natural. Para que isso não aconteça é necessário buscar mecanismos de adaptações, tendo como finalidade a diminuição e o controle dos danos provenientes dos estresses, como o estresse oxidativo. O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre os agentes oxidantes e

antioxidantes em um sistema biológico proveniente do acúmulo dos níveis de oxidantes, prejudicando o controle redox e o reparo de danos moleculares (OLIVEIRA et al., 2018) pelas espécies reativas de oxigênio (ROS).

O aumento de ROS funciona como mecanismos de resposta da planta ao estresse. Normalmente, ROS são produzidas em diversas vias metabólicas das plantas, como a fotossíntese e a respiração por meio dos organelos celulares, como mitocôndrios e cloroplastos, que são os locais principais de produção (GILL; TUTEJA 2010; SANDALIO et al., 2013), incluindo os peroxissomos por meio da ação das enzimas do processo de fotorrespiração (DEL RIO et al., 2006). São responsáveis por reações, causando o fortalecimento da parede celular vegetal, impedindo a entrada do patógeno, por meio da liberação de compostos sinalizadores (FINKEL, 2000; AGRIOS, 2004; LEÓN; MONTESANO, 2013). As ROS são resultantes da redução do oxigênio molecular (O_2), contendo radicais livres, como superóxido ($O_2^{\bullet}$), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e produtos não radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio atômico ($1O_2$), entre outros (HALLIWELL; GUTTERIDGE 2007; GILL; TUTEJA, 2010; SANDALIO et al., 2013; GILL et al., 2015).

As plantas produzem constantemente O_2 durante a fotossíntese, o qual é utilizado no metabolismo aeróbico no processo de respiração celular. Entretanto, quando são produzidos em baixas concentrações, não promovem danos celulares nos tecidos vegetais. Por outro lado, quando as plantas são submetidas a situações de estresse, há um desequilíbrio entre a produção e eliminação de ROS, desencadeando inúmeras respostas da planta, como a disfunção celular, lesões necróticas e, em último caso, a morte celular programada (SHARMA et al., 2012). Nesse processo, ocorre uma explosão oxidativa pelo aumento de ROS dentro das células, como consequência, esses danos são visivelmente expostos nas folhas por meio do surgimento de clorose e, posteriormente, de necrose e abscisão foliar (CAVATTE et al., 2012).

O processo de eliminação de ROS ocorre por meio de sistemas antioxidantes, concebido por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos, que metabolizam ROS e os produtos de sua reação (GILL; TUTEJA, 2010; HASANUZZAMAN et al., 2012). Nos mecanismos não-enzimáticos fazem partes ácido ascórbico e seus derivados, hidroquinonas e tióis, pertencentes ao grupo de oxigênio e de eliminação de radicais livres (OLIVEIRA et al., 2018). Estes, por sua vez, impedem o processo de oxidação

e degradação da célula por meio de reações químicas estáveis (MATROS et al., 2015). Já nos mecanismos enzimáticos as plantas incluem enzimas como dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase do guaiacol (GPX), redutase da glutathione (GR), redutase monodeidroascorbato (MDHAR), redutase desidroascorbato (DHAR) e glutathione S-transferase (GST) (HASANUZZAMAN et al., 2012). As enzimas SOD, CAT e GPX, que removem os radicais livres de um sistema biológico, apresentam um papel relevante na prevenção do estresse oxidativo (NIMSE et al., 2015).

A enzima SOD, de acordo com o seu cofactor de metal, pode ser classificada em Fe SOD, Mn SOD e Cu-Zn SOD (KANDAZ et al., 2009; ALSCHER et al., 2002), está presente nos compartimentos celulares onde estão havendo estresses oxidativos. Esta enzima se destaca por ser a primeira linha de defesa contra ROS, catalisando a dismutação de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 e O_2 em todos os compartimentos subcelulares (GILL; TUTEJA, 2010). Geralmente, SOD é uma enzima presente no citosol e no mitocôndrio (OLIVEIRA et al., 2018). Os produtos da dismutação, em altas concentrações dentro da célula, promove o aumento de OH^- o qual deve ser evitado. Para a eliminação de OH^- , faz-se necessário a ação de outras enzimas do mecanismo antioxidante de defesa (NOCTOR; FOYER, 1998). Com concentrações elevadas de H_2O_2 dentro das células, enzimas como a catalase atuam nos peroxissomos, glioxissomos e citosol, podendo ser encontrada também em mitocôndrios, sua função é converter H_2O_2 a H_2O e O_2 , produtos gerados em diferentes processos como fotorrespiração e β -oxidação de ácidos graxos (MITTLER, 2002; PERL-TREVES; PERL, 2002). A catalase, considerada uma heme proteína, é capaz de dismutar uma média de 6.000.000 moléculas de H_2O_2 por minuto (GILL; TUTEJA, 2010).

A peroxidase de ascorbato, outra enzima importante no processo antioxidativo, está localizada nos cloroplastos (membrana dos tilacóides e estroma) e no citosol (ASADA; TAKAHASHI; 1987; MADHUSUDHAN et al., 2003; SHARMA et al., 2012). Atua convertendo H_2O_2 para H_2O , usando na reação o ácido ascórbico, um composto não enzimático, funcionando como um doador de elétrons para a reação. Por outro lado, GPX, assim como APX, utiliza outras moléculas redutoras com a finalidade de dismutar o H_2O_2 . Nos cloroplastos, a presença da molécula GR aumenta a produção de GSH, o qual atua, juntamente com o ascorbato na atividade de APX, e contribui na regeneração da GSSG formada na redução do H_2O_2 a H_2O

pela GPX (APEL; HIRT, 2004). A enzima GPX, atua utilizando fenóis aromáticos como guaiacol ou o pirogallol, está associada com muitos processos biossintéticos, incluindo lignificação da parede celular, degradação do ácido indolacético (AIA), biossíntese do etileno e defesa contra estresses bióticos e abióticos nas plantas (GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA, 2012).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e condições de cultivo

As plantas seminais dos genótipos de *T. cacao* 'Catongo' (intolerante ao fungo *M. pernicioso*) e CCN 51 (tolerante), contrastantes quanto à susceptibilidade, foram obtidas por meio de polinização manual de 10 plantas de cada genótipo, com 8 a 10 anos de idade. As plantas fazem parte do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Cacau do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) e foram obtidas usando a técnica de enxertia por borbulhia, tendo como porta-enxerto o *T. cacao* 'Comum'.

Após a maturação dos frutos, foram coletados, aleatoriamente, dois frutos de cada planta e genótipo, totalizando 20 frutos por genótipo. Posteriormente, retiraram-se as sementes dos frutos de cada genótipo, descartando aquelas danificadas mecanicamente ou por incidência de pragas e, ou doenças. Em seguida, as sementes dos 20 frutos de cada genótipo foram reunidas e colocadas separadamente, por genótipo, em dois recipientes plásticos de 20 L. Logo após, fez-se a mistura manual das sementes de cada genótipo e coletou-se amostras aleatórias de 50 sementes para cada tratamento e repetições propostos. Em seguida, fez-se a retirada da polpa mucilagínosa que envolve as sementes de *T. cacao*, com o auxílio de pó de serra. Imediatamente após, procedeu-se, também, a retirada do tegumento que envolve os cotilédones, com o auxílio de pinças cirúrgicas estéreis, seguindo as condições sanitárias de materiais e equipamentos para germinação de sementes. Após a completa exposição dos cotilédones das sementes, os mesmos foram submetidos, imediatamente, a diferentes concentrações de elicitores químicos.

De posse de vários testes preliminares, utilizando diferentes concentrações dos elicitores químicos sacarose, glicose e ácido salicílico, foram selecionados os seguintes tratamentos: sacarose (SAC) a 0,45 M, glicose (GLI) a 0,35 M, ácido salicílico (AS) a 0,8 g/L e água deionizada, sem elicitores químicos. Prepararam-se, previamente, 500 mL de solução para cada tratamento e repetição, totalizando-se quatro tratamentos (incluindo o controle), quatro repetições e 50 sementes por unidade experimental. As soluções dos diferentes tratamentos e repetições foram

colocadas em béqueres individuais de 1 L, contendo cada béquer 50 sementes, cujos cotilédones foram totalmente expostos. As sementes, desprovidas de tegumento, permaneceram por 24 h nas soluções dos diferentes elicitores químicos e controle, para evitar que houvesse o processo de fermentação. Logo após, quando a maioria das sementes embebidas já se apresentava com a protrusão da raiz primária, foram transferidas para tubetes de polietileno, com capacidade de 288 cm³, contendo substrato orgânico (casca de *Pinnus* + fibra de coco na proporção de 1:1), enriquecido com macro e micronutrientes minerais, de acordo com as exigências da cultura, em condições de casa de vegetação. Posteriormente, aos 20 dias após a emergência das plântulas, induzidas pelos elicitores químicos + controle, fez-se a inoculação das gemas apicais com o fungo *M. perniciosa*.

3.2. Inoculação de *Moniliophthora perniciosa*

Os basidiósporos viáveis do fungo *M. perniciosa*, obtidos do Laboratório de Fitopatologia Molecular do CEPEC/CEPLAC, foram preparados em suspensão. As gemas apicais das plântulas de 'Catongo' e CCN 51 foram inoculadas com *M. perniciosa* pelo método de gotejamento. Durante o processo de inoculação foram realizados os seguintes procedimentos: inoculações com ágar de crescimento rápido com uma suspensão de 20 uL de basidiósporos a uma concentração de 200.000 basidiosporos viável mL⁻¹, seguido de permanência das plântulas por 48 h em câmara úmida e escura, a uma temperatura média de 27±2 °C e umidade relativa do ar em torno de 95%.

3.3. Coleta de material vegetal para análises

Para as análises bioquímicas e moleculares foram realizadas coletas de folhas das plântulas induzidas de ambos os genótipos de *T. cacao*, 'Catongo' e CCN 51, infectadas + elicitores químicos (sacarose, glicose e ácido salicílico) e infectadas, 48 h após a inoculação. Imediatamente após a coleta, as amostras de material vegetal foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer – 80 °C. Posteriormente, foram liofilizadas e armazenadas a – 20 °C até o momento de sua utilização.

3.4. Metabolismo antioxidativo

Para o experimento de atividade enzimática, foram usadas amostras foliares liofilizadas, de plantas jovens de ambos os genótipos de *T. cacao* ('Catongo' e CCN 51) infectados com *M. pernicioso* (controle) e infectados com *M. pernicioso* + elicitores químicos (sacarose – SAC, glicose – GLI e ácido salicílico – SAC), coletadas 48 h após a inoculação. O tecido vegetal foi submetido à maceração em nitrogênio líquido. Logo após, foram pesados 20 mg do material macerado em balança analítica (SHIMADZO – AUW 220), seguido da adição de 0,07 g de polivinilpirrolidona (PVPP)/g de tecido, para evitar a oxidação do mesmo. Posteriormente, o material macerado foi ressuspenso em 800 µL tampão de extração (específico para cada enzima) e agitado em vórtex. Em seguida, as amostras foram sonicadas em ultrassonicador de sonda (Gex 130, 130 W) sob amplitude de 70%, 10 pulsos de 5 s, com intervalos de 10 s, e submetidos a centrifugação de 14.000 x g por 10 min a 4 °C. Logo após, o sobrenadante foi coletado para um novo tubo, obtendo-se, assim, o extrato bruto, o qual foi imediatamente usado. Os ensaios enzimáticos foram realizados no espectrofotômetro de microplacas *Espectramax Paradigm* (Molecular Devices).

3.4.1. Dismutase do superóxido (SOD)

A atividade de SOD foi determinada conforme Gianopolitis e Ries (1977) com modificações. A unidade de atividade foi calculada para medir a capacidade da enzima de inibir 50% da redução fotoquímica do nitroazul de tetrazólio (NBT), que leva a formação do precipitado formazana azul. Foi utilizado 20 µL do extrato bruto, em tampão de extração, que continha fosfato de potássio, 50 mM, pH 6,0, EDTA a 1mM e metionina a 13 mM. A atividade enzimática teve início com a adição de riboflavina a 1 mM. A primeira leitura ocorreu após a placa ter sido mantida no escuro por 5 min e a segunda leitura foi realizada após a placa ter sido submetida à luz fluorescente de 15 W por mais 10 min. Os brancos foram os poços que não continham extrato vegetal. As leituras foram lidas em quadruplicatas em comprimento de onda de 560 nm.

3.4.2. Catalase (CAT)

O ensaio enzimático para CAT foi realizado por meio da determinação do consumo do H_2O_2 , segundo a metodologia descrita por Havir e Mchale (1987), com algumas modificações. A temperatura utilizada foi de 30 °C, momento no qual foi adicionado tampão de reação (tampão fosfato de sódio a 50 mM, pH 7,0) em 20 μL do extrato vegetal foliar. A reação teve início com o acréscimo de H_2O_2 a 30 mM, sendo as leituras realizadas em quadruplicatas, calculando-se o decaimento em comprimento de onda de 240 nm por 300 s, contra um branco sem extrato vegetal, e expressa em $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$, usando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M cm^{-1} .

3.4.3. Peroxidase do ascorbato (APX)

A determinação da atividade de APX foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Nakano e Asada (1981), com modificações. O tampão para a reação utilizado foi o de fosfato de potássio a 50 mM, acrescido de ascorbato a 0,5 mM, EDTA a 0,1 mM e H_2O_2 a 0,1 mM. Na reação, a presença de APX no extrato vegetal (10 μL) reduz a concentração de H_2O_2 do meio, em função da redução de ácido ascórbico adicionado. O decaimento foi acompanhado no comprimento de onda de 290 nm por 300 s, com leituras a cada 30 s, numa temperatura de 30 °C. A análise foi feita em quadruplicata e os valores expressos em $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$.

3.4.4. Peroxidase do guaiacol (GPX)

A atividade de GPX foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rehem et al. (2011), baseada no aumento do consumo de guaiacol em $\mu\text{mol s}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MS}$. A mistura reagente consistiu em 140 μL de tampão de reação GPX 2x (guaiacol a 40 mmol L^{-1} , H_2O_2 a 30% e fosfato de sódio a 50 mmol L^{-1} , pH 6,0). Nesta solução foi adicionado 2 μL do extrato bruto. As leituras de absorbância foram realizadas em quadruplicadas em comprimento de onda de 470 nm, a 25°C. O consumo de guaiacol, em $\text{mmol h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MS}$, foi calculado com o uso da equação $y = 0,1284x +$

0,0189 ($R^2 = 0,99$), originada a partir de uma curva padrão para POD-guaiacol (REHEM et al., 2011).

3.5. Análise Western Blot

3.5.1. Extração de proteínas

Para a preparação do material, foram usadas amostras foliares liofilizadas, de ambos os genótipos de *T. cacao* ('Catongo' e CCN 51) infectados com *M. perniciosa* (controle) e infectados com *M. perniciosa* + elicitores químicos (sacarose – SAC, glicose – GLI e ácido salicílico – SAC), coletadas 48 h após a inoculação, seguindo o protocolo desenvolvido por Pirovani et al. (2008), com modificações. Aproximadamente 0,4 g de folhas foi macerada, juntamente com nitrogênio líquido e 0,07g de polivinilpirrolidona (PVPP), até atingir a textura de pó fino. Após a maceração, as amostras foram distribuídas em microtubos de 2 mL, para que fossem submetidas às lavagens. Inicialmente, o material foi lavado com acetona a 100% e centrifugado a 14.000 x g por 15 min à temperatura de 4 °C, cujo passo foi repetido quatro vezes. Entre uma lavagem e outra, as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições iniciais e o sobrenadante descartado. Durante todo este processo de extração, as amostras foram mantidas em banho de gelo. Logo após, o precipitado foi seco em câmara de fluxo laminar à temperatura ambiente por 1 h. Em seguida, o *pellet* foi lavado com ácido tricloroacético (TCA) a 10 % em acetona, contendo β -mercaptoetanol a 0,07%. As lavagens foram repetidas até que as amostras perdessem a coloração. Entre uma lavagem e outra, as amostras foram centrifugadas, nas mesmas condições do passo anterior, e homogeneizadas com o uso de vortex. Em seguida, foram feitas lavagens com TCA a 10% em água, seguida de homogeneização por sonicação (amplitude 70%, 5 s ligado e 10 s de repouso por 1 min) e posterior centrifugação para descarte do sobrenadante. Esta etapa foi repetida três vezes e, ao final, foi feita uma primeira precipitação por aproximadamente 1 h a 20 °C, usando as mesmas condições de centrifugação.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as amostras submetidas a lavagens com acetona a 80% por duas vezes. A cada lavagem, o precipitado foi ressuspenso com o uso do vortex e sonicado quando necessário. Na última lavagem, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco a temperatura ambiente em

câmara de fluxo laminar. Posteriormente, as amostras foliares foram submetidas a uma segunda extração, que consistiu, inicialmente, em adicionar ao pó seco, obtido na etapa anterior, 800 μL de SDS-denso (Tris-HCl a 100 mmol L^{-1} , pH 8, sacarose a 30%, SDS a 2% e β -mercaptoetanol a 5%) e 800 μL de fenol a 99%, tamponado com Tris-HCL, pH 8. Em seguida, a solução foi homogeneizada, com o uso de vortex, por aproximadamente 1 min, com intervalos em gelo para manter a temperatura baixa.

Logo após, o conteúdo foi centrifugado a 4°C por 15 min a $14.000 \times g$. Imediatamente após, a fase fenólica (superior), contendo as proteínas, foi então retirada e acondicionada em um novo tubo de centrífuga (50 mL), onde foram adicionados 5 mL de acetato de amônio a $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em metanol gelado e deixados a -20°C *overnight*. No dia seguinte, os precipitados protéicos foram recuperados por centrifugação ($14.000 \times g$) a 4°C por 15 min. Em seguida, foram lavados por 2 vezes com acetato de amônio a $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em metanol gelado. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensionado e centrifugado a cada lavagem sob as mesmas condições anteriores. Posteriormente, o material foi lavado em acetona a 80% por duas vezes, seguido da secagem do *pellet* à temperatura ambiente. Logo após, o *pellet* foi ressuspensionado em 800 μL de tampão de reidratação (Ureia a 7 mol L^{-1} , Tioureia a 2 mol L^{-1} , CHAPS a 2%, azul de Bromofenol a 0,002%). As proteínas foram quantificadas utilizando o *Kit 2-D Quant* de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare).

3.5.2. Análise de acumulação de proteínas por *immunoblotting*

Realizou-se a técnica do *Western blot* para a análise do acúmulo de proteínas específicas nas amostras foliares de plantas jovens dos genótipos de *T. cacao* CCN 51 e Catongo, infectados com *M. pernicioso* (Controle) e infectados com *M. pernicioso* + elicitores químicos (sacarose, glicose e ácido salicílico), coletadas 48h após a inoculação. Uma quantidade equivalente a 30 μg de proteínas de cada amostra foram separadas em um mini gel SDS-PAGE (acrilamida a 12,5%) como foi descrito anteriormente. O marcador utilizado foi *PageRuler Prestained Protein Ladder de 10-180 kDa* (Thermo Fisher Scientific). Logo após, foi realizada a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose. Em seguida, colocou-se a membrana para corar no corante denominado *Ponceau*, a fim de

observar se o processo de transferência ocorreu. Em seguida, foram feitas lavagens com tampão de TBS-T (Tris-HCl a 100 mM, pH 8,0, NaCl a 140 mM, Tween 20 a 0,05%) para descorar a membrana. A membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado (w/v) em tampão de TBS-T. Posteriormente, foram realizadas lavagens com o tampão TBS-T, retirando todo o excesso do leite.

A subunidade beta da catalase (Cat, 55 kDa), ATP sintase (*ATP β sintase*, 53 kDa) e proteína de ligação (BiP, 80 kDa) foram detectadas, utilizando os seguintes anticorpos primários policlonais na proporção, (1 : 1000) anticatalase de *A. thaliana* (Agrisera-AS095001), (1: 2000) anti-sintase ATP de *Arabidopsis thaliana* (Agrisera-AS05085) e (1 : 2000) anti-BiP de *A. thaliana* (Agrisera-AS09481). A seguir, as membranas foram incubadas com 50 mL dos respectivos anticorpos primários, durante 60 min sob agitação constante. Seguindo o processo, realizou-se três vezes a lavagem da membrana com o tampão de TBS-T, sob agitação. As membranas foram incubadas durante 60 min com o anticorpo secundário IgG de coelho anticabra, conjugado com fosfatase alcalina (*Thermo Fisher Scientific-65-6122*) durante 60 min. O fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP) e *p*-nitrotetrazolium (NBT; Promega, EUA) foram utilizados como substratos para a reação colorimétrica da atividade da fosfatase alcalina. O acúmulo de catalase, *ATP- β sintase* e BiP foram quantificadas a partir de imagens da membrana, utilizando o *software GelQuant.Net 1.8.0* (www.biochemlabsolutions.com).

3.6. Análise proteômica

3.6.1. Extração de proteínas

Para extração de proteínas, foram usadas apenas amostras foliares liofilizadas, de plantas jovens dos genótipos de *T. cacao* Catongo e CCN 51 infectados com *M. pernicioso* (controle) e infectado + elicitor químico (glicose), coletadas 48h após a inoculação, seguindo o protocolo desenvolvido por Pirovani et al. (2008), com modificações. Aproximadamente 0,4 g de folhas liofilizadas foi macerada, em presença de nitrogênio líquido e de 0,07 g de polivinilpirrolidona (PVPP), até atingir a textura de pó fino. Após a maceração, as amostras foram distribuídas em *ependorfs* de 2 mL, para que fossem submetidas às lavagens. Inicialmente, o material foi lavado com acetona a 100% e centrifugado a 14.000 x g

por 15 min à temperatura de 4 °C, cujo passo foi repetido quatro vezes. Entre uma lavagem e outra, as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições iniciais e o sobrenadante descartado. Durante todo este processo de extração, as amostras foram mantidas em banho de gelo. Logo após, o *pellet* foi seco em câmara de fluxo laminar à temperatura ambiente por 1 h. Em seguida, o *pellet* foi lavado com ácido tricloroacético (TCA) a 10% em acetona, contendo β-mercaptoetanol a 0,07 %. As lavagens foram repetidas até que as amostras perdessem a coloração. Entre uma lavagem e outra, as amostras foram centrifugadas, nas mesmas condições do passo anterior, e homogeneizadas com o uso de vortex. Logo após, foram feitas lavagens com TCA a 10% em água, seguida de homogeneização por sonicação (amplitude 70%, 5 s ligado e 10 s de repouso por 1 min) e posterior centrifugação para descarte do sobrenadante. Esta etapa foi repetida três vezes e, ao final, foi feita uma primeira precipitação por aproximadamente 1 h a 20 °C, usando as mesmas condições de centrifugação. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as amostras submetidas a lavagens com acetona a 80% por duas vezes. A cada lavagem, o precipitado foi ressuspenso com o uso do vortex e sonicado quando necessário. Na última lavagem, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco a temperatura ambiente em câmara de fluxo laminar.

Posteriormente, as amostras foliares foram submetidas a uma segunda extração, que consistiu, inicialmente, em adicionar ao pó seco, obtido na etapa anterior, 800 µL de SDS-denso (Tris-HCl 100 mol L⁻¹, pH 8, sacarose a 30%, SDS a 2% e β-mercaptoetanol a 5%) e 800 µL de fenol a 99%, tamponado com Tris-HCL, pH 8. Em seguida, a solução foi homogeneizada, com o uso de vortex, por aproximadamente 1 min, com intervalos em gelo para manter a temperatura baixa. Logo após, o conteúdo foi centrifugado a 4 °C por 15 min a 14.000 x g. Imediatamente após, a fase fenólica (superior), contendo as proteínas, foi então retirada e acondicionada em um novo tubo de centrífuga (50 mL), onde foram adicionados 5 mL de acetato de amônio a 0,1 mmol L⁻¹ em metanol gelado e deixados a - 20 °C *overnight*. No dia seguinte, os precipitados protéicos foram recuperados por centrifugação (14.000 x g) a 4 °C por 15 min. Em seguida, foram lavados por 2 vezes com acetato de amônio a 0,1 mol L⁻¹ em metanol gelado. Logo após, o *pellet* foi ressuspenso e centrifugado a cada lavagem sob as mesmas condições anteriores. Posteriormente, o material foi lavado em acetona a 80% por duas vezes, seguido da secagem do *pellet* à temperatura ambiente. Imediatamente

após, o *pellet* foi ressuspensionado em 800 µL de tampão de reidratação (Ureia a 7 mol L⁻¹, Tioureia a 2 mol L⁻¹, CHAPS a 2%, azul de Bromofenol a 0,002 %). Finalmente, as proteínas foram estocadas em freezer a – 20 °C até o momento de seu uso.

3.6.2. Quantificação das proteínas

Os extratos protéicos obtidos foram quantificados com o *2D Quant Kit* (GE Healthcare Life Sciences), seguindo as recomendações do fabricante. O padrão utilizado foi diferentes concentrações de soro albumina bovina (BSA), que serviu como base para gerar uma curva padrão de dosagem para a quantificação das amostras foliares de *T. cacao*. Tanto a curva quanto as amostras foram preparadas em triplicata, usando microtubos do tipo *eppendorf* de 2 mL. Inicialmente, foi adicionado a todos os microtubos (padrão e amostras) 100 µL de solução precipitante. Logo após, foram adicionados 2 µL das amostras ressuspensas em tampão de reidratação e as concentrações correspondentes do padrão aos microtubos da curva, sendo brevemente homogeneizados em vortex.

Posteriormente, foram adicionados 100 µL de solução co-precipitante a cada microtubo, seguido de homogeneização por inversão. Em seguida, os microtubos foram submetidos à centrifugação a 4 °C por 15 min a 14.000 x g, seguido do descarte completo do sobrenadante. Ao *pellet* foram adicionados 20 µL de solução de cobre e 80 µL de água destilada e autoclavada, seguido de homogeneização em vortex, para dissolução do precipitado. Logo após, foram adicionados 200 µL do “reagente de cor de trabalho” (Reagente A + reagente B) em todos os *eppendorfs* e a solução formada foi incubada por 15 a 20 min a temperatura ambiente. Em seguida, as soluções foram transferidas para microplacas ELISA e submetidas à leitura em espectrofotômetro (480 nm), gerando uma curva padrão.

3.6.3. Eletroforese em gel SDS-PAGE

Após a etapa de quantificação, as amostras foram analisadas por SDS-PAGE em minicubas de eletroforese (Omniphor), com géis de 8 x 10 cm, contendo 12,5% de acrilamida. Foram utilizados 30 µg de cada amostra e a partir deste gel foi possível observar o perfil de bandas de proteínas totais.

3.6.4. Primeira dimensão: focalização isoeletrica

A primeira dimensão consiste em separar as proteínas pelo seu ponto isoeletrico, ou seja, as proteínas irão migrar por um gradiente até o ponto em que suas cargas líquidas irão se igualar a zero. Para tanto, foi necessário um total de 350 µg de proteínas, previamente solubilizadas em tampão de reidratação, no qual foi adicionado ditiootretol (DTT), na concentração de 50 mmol L⁻¹ e 0,5% de anfólitos para pH 3-10 não linear (NL) (*Amersham Biosciences*). A esta solução foi adicionado mais tampão de reidratação (quando necessário) até atingir o volume de 250 µL.

As amostras proteicas, em triplicatas, foram pipetadas em suporte específico para focalização, os chamados “sarcófagos” (*strip holder*), de forma que as extremidades positivas e negativas, dentro dos mesmos, fossem conectadas pela solução. Posteriormente, as tiras de gel (*strips*), com gradiente de pH imobilizado 3 a 10 NL, 13 cm (*Immobiline Dry Strip Gel*), foram colocadas, com o auxílio de uma pinça metálica, em contato direto com a amostra. Em seguida, foi adicionado 1 mL de óleo mineral (*Dry Strip Cover Fluid*) sobre as *strips* para evitar possível desidratação das mesmas. As *strip holders* foram transferidas para o equipamento de focalização isoeletrica *Ettan IPGphor III* (*GE Healthcare*), controlado pelo *software Ettan IPGphor III*, com as seguintes configurações: tempo de reidratação de 12 h a 20 °C; condições de corrida: 500 Vh por 1 h, 1000 Vh por 1h4min, 8000 Vh por 2h30min e 8000 Vh por 40 min.

3.6.5. Segunda dimensão: eletroforese em gel de poliacrilamida

Antes de serem submetidas à corrida eletroforética, as *strips* foram preparadas para a segunda dimensão, sendo transferidas, ao término da focalização, para tubos de ensaio, onde foram adicionados 7 mL de tampão de equilíbrio (uréia a 6 mol L⁻¹, Tris-HCl (75 mmol L⁻¹, pH 8,8), glicerol a 30%, SDS a 2% e azul de bromofenol a 0,002%), contendo DTT 10 mg mL⁻¹, sendo equilibradas por agitação suave durante 15 min. Essa fase ajuda a reduzir as pontes de dissulfeto presentes nas proteínas em conformação terciária e quaternária. A solução contendo DTT foi descartada em recipiente adequado e uma nova solução de tampão de equilíbrio, contendo iodoacetamida a 25 mg mL⁻¹, foi adicionada aos

tubos de ensaio e então agitadas suavemente por mais 15 min. Nesta etapa, as proteínas serão alquiladas. Novamente, a solução foi descartada e a terceira etapa de equilíbrio foi iniciada, adicionando 7 mL de tampão de corrida 1X (Tris a 25 mol L⁻¹, glicina a 1,92 mol L⁻¹, SDS a 1%, pH 8,5) aos tubos de ensaio, seguido de agitação por 15 min. Após o equilíbrio das *strips*, foi realizada a etapa da segunda dimensão, onde as proteínas foram separadas de acordo o seu peso molecular. Para tal procedimento, os géis foram submetidos à corrida eletroforética em cuba de eletroforese *SE 600 Ruby (GE Healthcare)*. Os géis de poliacrilamida a 12,5% foram confeccionados em triplicata para cada tratamento, utilizando soluções de acrilamida/bisacrilamida a 30% (29,2 g de acrilamida e 0,8 g de N-metil-bisacrilamida), tampão de resolução 1X (Tris-HCl a 0,375 mol L⁻¹, pH 8,8, SDS a 0,1%), 60 µL de persulfato de amônio a 10% e 6 µL de N,N,N',N'Tetrametiletilenodiamina (TEMED).

Após a polimerização, foi transferido, aproximadamente, 1 mL de solução selante 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%) aos géis, e sobre esta um pedaço de papel filtro contendo o marcador de peso molecular *Amersham Low Molecular Weight SDS Calibration Kit for SDS electrophoresis (GE Healthcare)*. Em seguida, as *strips* foram dispostas na parte superior do gel, sendo as extremidades positivas direcionadas a mesma posição e em direção ao marcador como método padrão. Logo após, adicionou-se, então, mais da solução selante até que esta cobrisse toda a *strip*. Procedeu-se, em seguida, com a montagem da cuba e a adição de tampão de corrida 1X (Tris Base a 25 mol L⁻¹, glicina a 0,192 mol L⁻¹, dodecil sulfato de sódio – SDS a 1%). Com as *strips* prontas e já na cuba, iniciou-se a corrida, seguindo os seguintes parâmetros: 15 mA/gel por 15 min, 40 mA/gel por 30 min e, por fim, 50 mA/gel por 4 h ou até que ocorresse toda a migração da amostra no gel, que foi acompanhada observando o deslocamento do selante, assim como do marcador no gel.

Após a corrida, os géis foram retirados da cuba e fixados em tampão de fixação (etanol a 40% e ácido acético a 10%) por 1 h, seguido da retirada do tampão de fixação e adição de corante azul de *coomassie* coloidal (sulfato de amônio a 8%, ácido fosfórico a 0,08%, *coomassie blue* G-250 a 0,08% e metanol a 20%). Posteriormente, os géis ficaram corando por cinco a sete dias, com o auxílio de um agitador. Passado este período, o corante foi devolvido para reutilização e iniciou-se

a etapa de lavagens dos géis com água destilada e autoclavada, sendo realizadas lavagens diárias, quantas vezes fossem necessárias. Finalmente, depois de descorados, os géis foram digitalizados com um auxílio do *LabScanner* (Amersham Bioscience) e imersos em solução de ácido acético a 7%, para conservação dos mesmos até que fossem realizadas as análises seguintes.

3.6.6. Análise dos géis

Após os géis serem digitalizados pelo *LabScanner* (Amersham Bioscience) foram enviados para o software *Image Master 2D Platinum 7.0* (GE healthcare). As quantidades de *spots* em cada tratamento nos géis, bem como suas intensidades foram analisados. Os valores de ponto isoelétrico e peso molecular de cada *spot* foram marcados individualmente. As análises foram feitas dentro do mesmo genótipo, comparando o tratamento (infectado + glicose) com o controle (infectado). Os géis foram confeccionados em triplicata para cada tratamento, a fim de aumentar a sua reprodutibilidade. Além disso, em cada triplicata um gel foi escolhido como referência. Todos os géis, dentro do genótipo, foram sobrepostos para que os *spots* fossem reconhecidos automaticamente pelo programa, seguido de algumas modificações manuais. O cálculo de ANOVA foi utilizado para identificar os perfis protéicos entre os diferentes géis, sendo considerando valores de $p \leq 0,05$.

3.6.7. Excisão dos spots e extrações de peptídeos

Os *spots* de interesse de cada tratamento (diferencialmente acumulados) foram excisados do gel e fragmentados com o auxílio de um bisturi. Logo após, foram descorados com 200 μL de NH_4HCO_3 a 25 mM, contendo acetonitrila 50%, *overnight*. O sobrenadante foi descartado e os fragmentos de gel foram lavados com 200 μL de água *Milli-Q* e, posteriormente, desidratados em 100 μL de acetonitrila a 100% por 10 min, a temperatura ambiente. Logo após, foram secos usando centrífuga a vácuo no *concentrator* 5301 (*Eppendorf*) por 20 min. Após secagem, foram adicionados 4 μL de solução gelada de tripsina *Gold* (*Promega*) 25 ng/ μL , e deixados a 4°C por 10 min, para absorção da mesma nos fragmentos de gel. Feito isso, foi adicionado uma solução de NH_4HCO_3 a 25 mM até cobrir o gel, seguido de incubação a 37°C por 16 a 24 h para ação da tripsina. Para a extração peptídica, o

sobrenadante de cada tubo foi coletado e transferido para um novo set de tubos. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com 50 µL de acetonitrila a 50% contendo ácido fórmico a 5%, sob agitação durante 30 min em *termomix Thermo Finemixer* (SH2000-DX). Ao fim de cada lavagem, os sobrenadantes foram adicionados aos tubos novos. Ao término da extração, as amostras tiveram o volume reduzido a vácuo até atingir aproximadamente 20 a 15 µL.

3.6.8. Espectrometria de massas (MS/MS)

Os peptídeos foram analisados por cromatografia de fase-reversa no *nanoAcquity UPLC (WATERS)* em duas colunas C18, sendo a primeira uma coluna "trapping" de 5 µm, 180 µm x 20 mm e a segunda de 1,7 µm 100 µm x 100 mm, sob um fluxo de 0,6 µL min⁻¹ em uma corrida de 50 min, onde foram coletados 4 µL de cada amostra. Os peptídeos foram separados de acordo com um gradiente de acetonitrila, sendo 1% até 1 min, de 1% a 50% em 40 min, de 50% a 85% em 5 min, mantendo-se nessa concentração por mais 2 min, voltando à concentração de 1% em 1 min e permanecendo nessa condição por 2 min, totalizando 50 min de corrida. Os peptídeos separados foram ionizados em um capilar sob voltagem de 3000 V (*Micromass Q-TOFmicro*), fragmentados no modo positivo com seleção da intensidade relativa mínima de 10 *counts*, sendo analisados os 3 íons mais intensos por cada varredura de 1 s, com energia de colisão variando entre 20 e 95 eV de acordo com a relação massa/carga (*m/z*) dos peptídeos.

3.6.9. Processamento e anotação das proteínas

Os espectros gerados foram analisados utilizando o *software ProteinLynx v 2.3* e comparados contra o banco de dados do NCBI, por meio da ferramenta *MASCOT MS/MS Ion Search* (www.matrixscience.com). As sequências FASTA geradas foram analisadas no *software BLAST2GO* (<http://www.blast2go.com>), o qual forneceram informações importantes, como ontologia, funções, processos biológicos e localização celular das proteínas.

3.7. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, correspondentes a dois genótipos de cacau ('Catongo' e CCN 51), três elicitores químicos (sacarose, glicose e ácido salicílico) e um sistema de inoculação (infectado com o fungo *M. pernicioso*), totalizando seis tratamentos com 50 plantas por unidade experimental. Para a análise do metabolismo antioxidativo e do *Western Blot* foram utilizados todos os tratamentos de ambos os genótipos em estudo, como citado anteriormente. Para a análise proteômica foi analisado o tratamento controle (Infectado com *M. pernicioso*) e o tratamento (infectado com *M. pernicioso* elicitado com glicose) de ambos os genótipos. Fez-se análise de variância e comparação de média dos tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), quando necessário.

4. RESULTADOS

4.1. METABOLISMO ANTIOXIDATIVO

4.1.1. Dismutase do superóxido (SOD)

Ao avaliar a atividade de SOD em nível foliar, verificou-se que há diferença significativa ($p < 0,05$) intragenotípica em todos os tratamentos. Sobre os genótipos, o 'Catongo' apresentou consideravelmente um aumento de 31%, 23% e 202% nos tratamentos infectados com *M. perniciosa* na presença de sacarose, glicose e ácido salicílico respectivamente, em relação ao controle (infectado com *M. perniciosa* na ausência de glicose). Por outro lado, houve uma diminuição da atividade de SOD no genótipo CCN 51, com 23% no tratamento infectado na presença de sacarose, 62% no infectado na presença de glicose e 79% no tratamento infectado na presença de ácido salicílico, quando comparados ao controle (Figura 1). Percebeu-se que o tratamento das sementes com ácido salicílico teve maior influência na atividade de SOD para o genótipo 'Catongo' e que esse genótipo tratado com os elicitores químicos, apresentou melhores respostas de defesa a exposição ao estresse pelo patógeno.

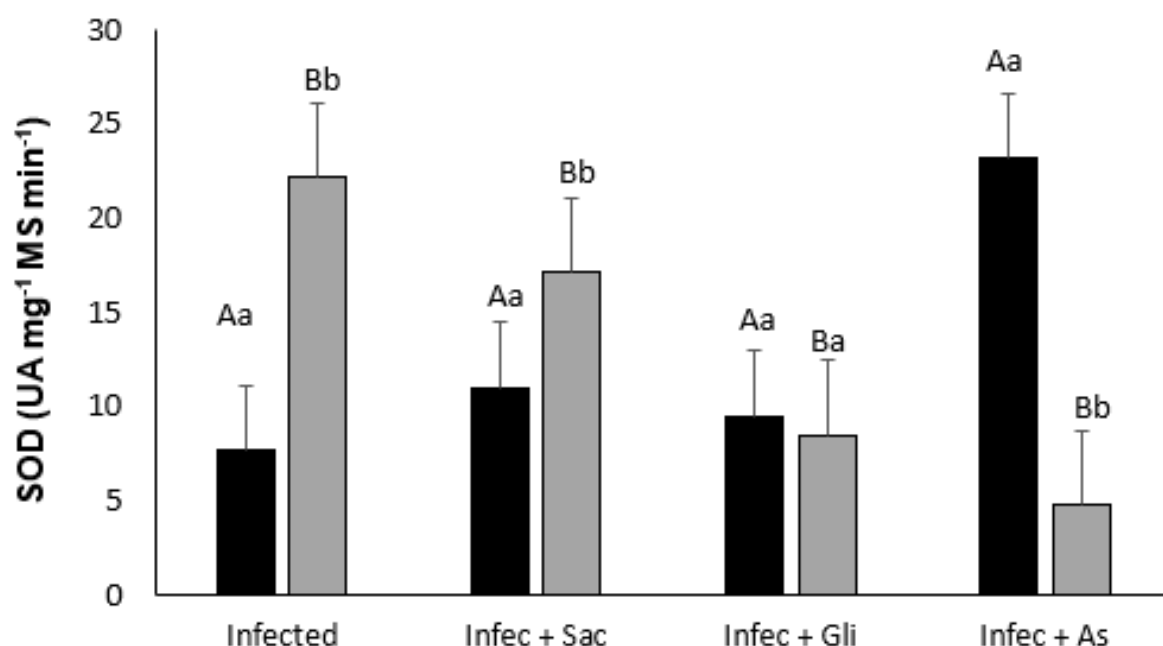


Figura 1 - Atividade de dismutase do superóxido (SOD), em folhas de plantas jovens de dois genótipos de *T. cacao* ['Catongo' – intolerante ■ e CCN 51 - tolerante ■ à (vassoura de bruxa)] infectados com *M. perniciosa* (controle) e infectados + tratados com diferentes elicitores químicos (sacarose – Sac, glicose – Gli e ácido salicílico - As), resultante de amostras foliares coletadas 48 h após a inoculação. As amostras foliares foram coletadas 48 h após a inoculação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas e, ou minúsculas não diferem entre si, dentro e entre genótipos, respectivamente, pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As barras correspondem aos erros padrões das médias.

4.1.2. Catalase (CAT)

Observou-se, também, para a atividade da catalase em nível foliar, que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas intragenotípicas para os tratamentos infectados com *M. perniciosa* na presença de sacarose e de ácido salicílico. A atividade da CAT aumentou nos tratamentos infectados com *M. perniciosa* na presença de sacarose e glicose do genótipo 'Catongo', sendo 309% e 112% respectivamente, apenas 15% para o tratamento infectado e elicitado com ácido salicílico, quando comparados com o controle. No genótipo CCN 51 também foi observado um aumento da atividade da CAT em 684% e 151% nos tratamentos infectados com *M. perniciosa* na presença de sacarose e ácido salicílico, respectivamente, sendo 12% para o tratamento infectado na presença de glicose, em relação ao controle (Figura 2). Os tratamentos infectados com *M. perniciosa* e

elicitados com sacarose apresentaram os melhores resultados nos dois genótipos em estudo.

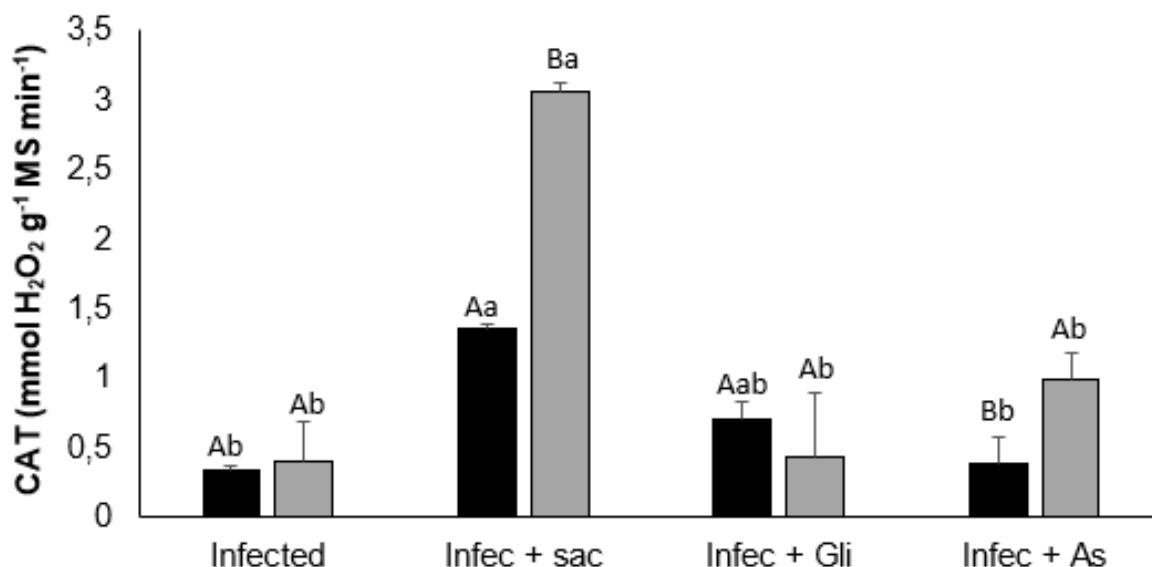


Figura 2 - Atividade de catalase (CAT), em folhas de plantas jovens de dois genótipos de *T. cacao* ['Catongo' - intolerante ■ e CCN 51 - tolerante ■ à (vassoura de bruxa)] infectados com *M. perniciosa* (controle) e infectados + tratados com diferentes elicitores químicos (sacarose – Sac, glicose – Gli e ácido salicílico - As) infectados com *M. perniciosa*, resultante de amostras foliares coletadas 48 h após a inoculação. As amostras foliares foram coletadas 48 h após a inoculação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas e, ou minúsculas não diferem entre si, dentro e entre genótipos, respectivamente, pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As barras correspondem aos erros padrões das médias.

4.1.3. Peroxidase do ascorbato (APX)

Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) intergenotípicas para a atividade de APX em nível foliar nos tratamentos infectados com *M. perniciosa* na presença de ácido salicílico. Não foi observado aumento da atividade da APX para o genótipo 'Catongo' nos tratamentos infectados com *M. perniciosa* na presença de sacarose, glicose e ácido salicílico, em comparação ao controle. No genótipo CCN 51 foi observado incrementos nos tratamentos infectados na presença dos elicitores. Sendo que houve um aumento de 43% e 212% para os tratamentos infectados com *M. perniciosa* na presença de glicose e ácido salicílico, respectivamente, quando comparados ao tratamento controle (Figura 3).

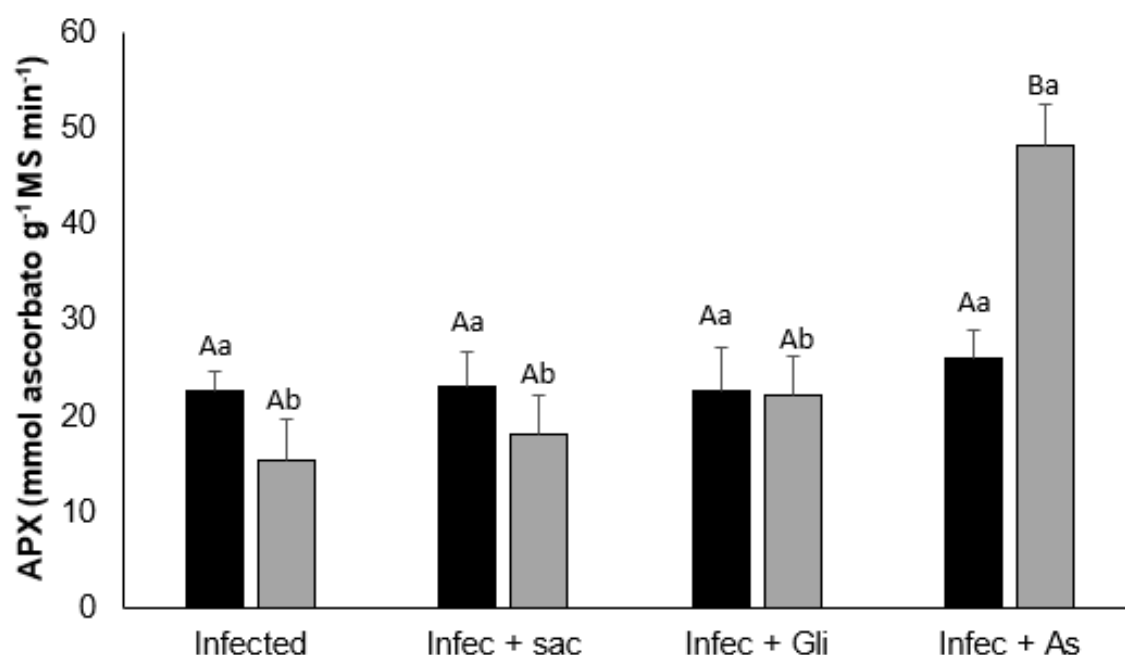


Figura 3 - Atividade da peroxidase do ascorbato (APX), em folhas de plantas jovens de dois genótipos de *T. cacao* ['Catongo' - intolerante ■ e CCN 51 – tolerante ■ à (vassoura de bruxa)] infectados com *M. pernicioso* (controle) e infectados + tratados com diferentes elicitores químicos (sacarose – Sac, glicose – Gli e ácido salicílico - As) infectados com *M. pernicioso*, resultante de amostras foliares coletadas 48 h após a inoculação. As amostras foliares foram coletadas 48 h após a inoculação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas e, ou minúsculas não diferem entre si, dentro e entre genótipos, respectivamente, pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As barras correspondem aos erros padrões das médias.

4.1.4. Peroxidase de guaiacol (GPX)

Ao avaliar a atividade da GPX, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) intergenotípicas em relação aos tratamentos com os diferentes elicitores químicos. Foram observadas diminuição na atividade de GPX em todos os tratamentos de ambos os genótipos quando comparados com os seus controles. No genótipo 'Catongo' houve reduções de 14,8%, 23,8% e 36,5% nos tratamentos infectados com *M. pernicioso* na presença de sacarose, glicose e ácido salicílico respectivamente, comparados ao controle. O genótipo CCN 51 também apresentou reduções da atividade da GPX em 60,4%, 63,5% e 63,7% nos tratamentos infectados com *M. pernicioso* na presença dos elicitores químicos sacarose, glicose e ácido salicílico respectivamente em relação ao controle. O genótipo 'Catongo' apresentou maior atividade da GPX, tanto no controle como nos tratamentos com os

elicitores químicos, quando comparado com os tratamentos e controle do genótipo CCN 51 (Figura 4).

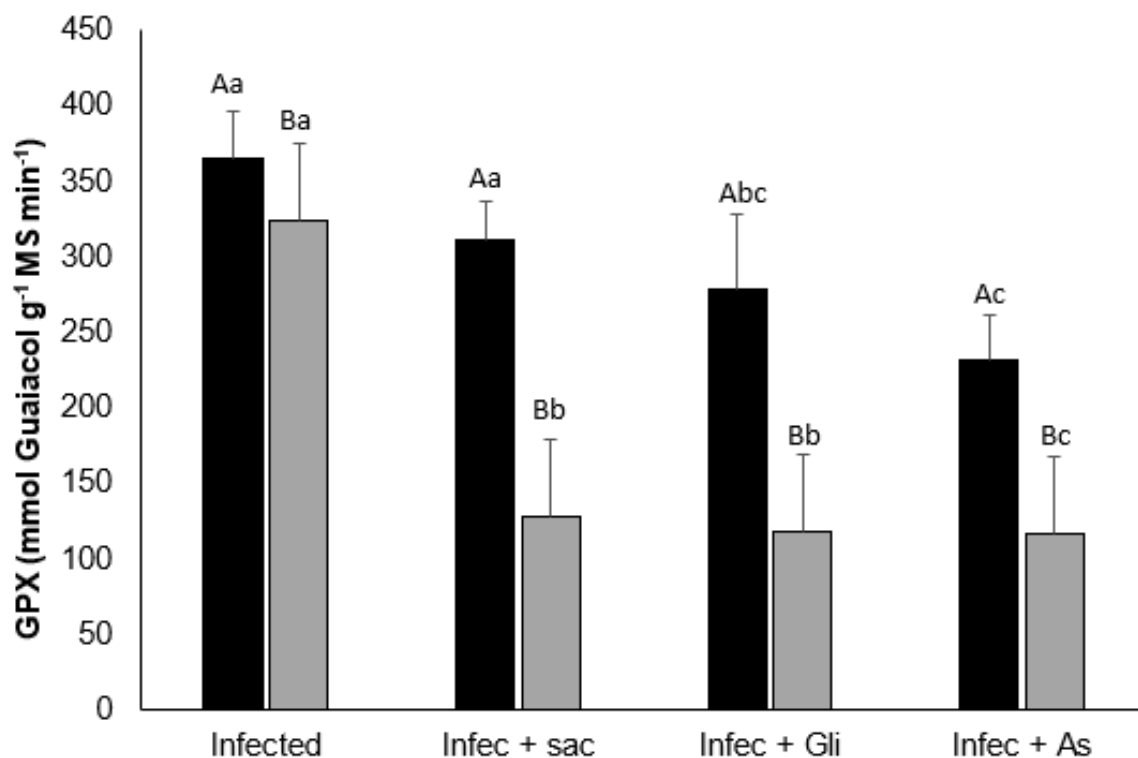


Figura 4 - Atividade de Peroxidase de guaiacol (GPX), em folhas de plantas jovens de dois genótipos de *T. cacao* ['Catongo' - intolerante ■ e CCN 51 - tolerante ■ à (vassoura de bruxa)] infectados com *M. pernicioso* (controle) e infectados + tratados com diferentes elicitores químicos (sacarose – Sac, glicose – Gli e ácido salicílico - As), resultante de amostras foliares coletadas 48 h após a inoculação. As amostras foliares foram coletadas 48 h após a inoculação. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas e, ou minúsculas não diferem entre si, dentro e entre genótipos, respectivamente, pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). As barras correspondem aos erros padrões das médias.

4.2. ACÚMULO DE PROTEÍNAS POR MEIO DO WESTERN BLOT

Os resultados das identificações da catalase, enzima relacionada ao metabolismo antioxidativo, por meio do *Western Blot*, mostra que houve um acúmulo foliar dessa enzima nos tratamentos com elicitores químicos (sacarose, glicose e ácido salicílico) na presença do patógeno em ambos os genótipos de *T. cacao* ('Catongo' e CCN 51) em comparação com seus respectivos controles (infectados com o patógeno na ausência dos elicitores) (Figura 5). Estas respostas de ambos os genótipos na presença do patógeno confirmam a eficiência dos elicitores químicos

(sacarose, glicose e ácido salicílico), que atuam por meio de cascatas de sinalizações, aumentando a atividade da enzima antioxidante catalase, para a redução do acúmulo de ROS induzido durante a infecção do fungo *M. pernicioso*.

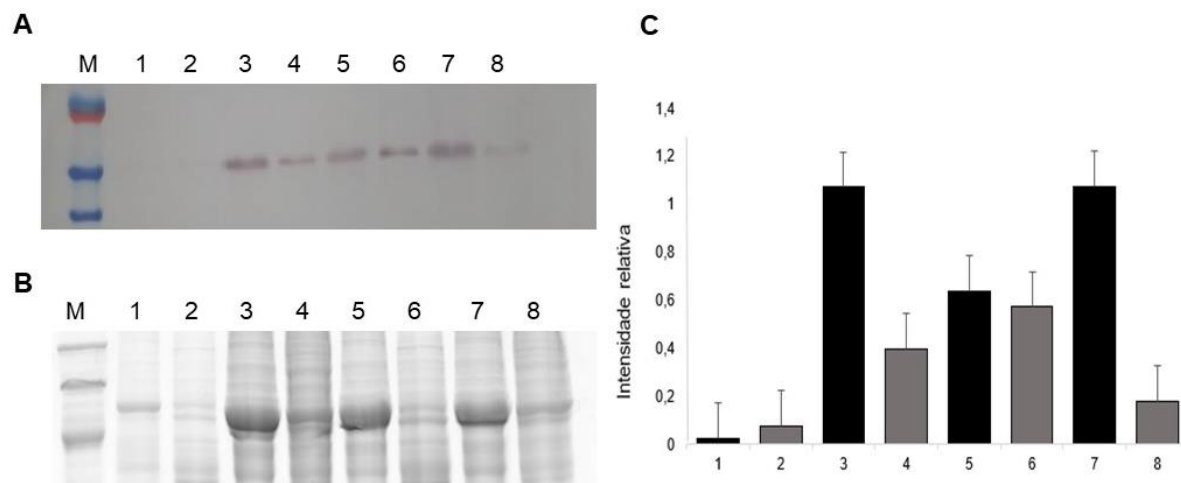


Figura 5 - (A) Identificação de catalase (CAT) por meio de Western blot. (M) marcador molecular, (1) controle ['Catongo' (Cat)], (2) controle (CCN 51), (3) tratamento infectado com *M. pernicioso* + sacarose ['Catongo' (Cat)], (4) tratamento infectado com *M. pernicioso* + sacarose (CCN51), (5) tratamento infectado com *M. pernicioso* + glicose ['Catongo' (Cat)], (6) tratamento infectado com *M. pernicioso* + glicose (CCN 51), (7) tratamento infectado com *M. pernicioso* + ácido salicílico ['Catongo' (Cat)] e (8) tratamento infectado com *M. pernicioso* + ácido salicílico (CCN 51). Genótipo de *T. cacao* 'Catongo' ■, intolerante ao fungo *M. pernicioso* e genótipo de *T. cacao* CCN 51 ■, tolerante ao fungo *M. pernicioso*. **(B)** Gel SDS-PAGE. **(C)** Houve expressão em intensidade de bandas nos tratamentos em relação aos controles.

A proteína β *AtpB* sintase, também, apresentou maior concentração em folhas de ambos os genótipos ('Catongo' e CCN 51) infectados com o patógeno e na presença dos três elicitores químicos utilizados, em comparação com os seus respectivos controles (infectados com o patógeno na ausência dos elicitores). Ainda, assim, observou-se que o aumento desta proteína foi maior nos tratamentos envolvendo o genótipo intolerante ao *M. pernicioso* ('Catongo') e o genótipo tolerante ao fungo (CCN 51) em comparação com seus respectivos controles (Figura 6).

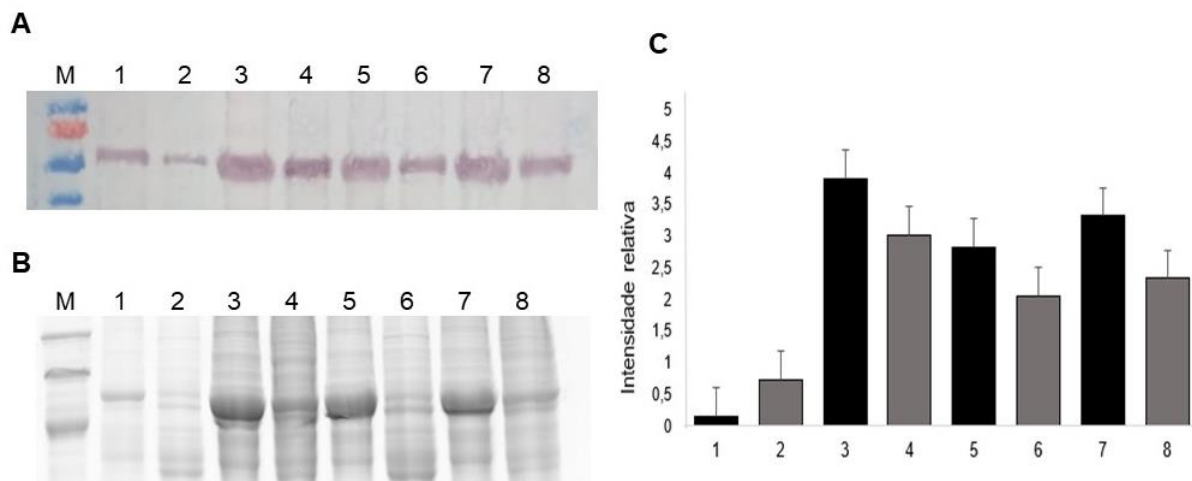


Figura 6 - (A) Identificação de *AtpB synthase* (53,9 kDa) por meio do *Western Blot*. (M) marcador molecular, (1) controle ['Catongo' (Cat)], (2) controle (CCN 51), (3) tratamento infectado com *M. pernicioso* + sacarose ['Catongo' (Cat)], (4) tratamento infectado com *M. pernicioso* + sacarose (CCN51), (5) tratamento infectado com *M. pernicioso* + glicose ['Catongo' (Cat)], (6) tratamento infectado com *M. pernicioso* + glicose (CCN 51), (7) tratamento infectado com *M. pernicioso* + ácido salicílico ['Catongo' (Cat)] e (8) tratamento infectado com *M. pernicioso* + ácido salicílico (CCN 51). Genótipo de *T. cacao* 'Catongo' ■, intolerante ao fungo *M. pernicioso* e genótipo de *T. cacao* CCN 51 ■, tolerante ao fungo *M. pernicioso*. **(B)** Gel SDS-PAGE. **(C)** Houve expressão em intensidade de bandas nos tratamentos em relação aos controles.

Em relação à análise de detecção da proteína foliar Bip nos genótipos 'Catongo' e CCN 51 e em seus respectivos tratamentos (infectados com *M. pernicioso* e na presença de elicitores) e controles (infectados com *M. pernicioso*), verificou-se que o genótipo CCN 51 apresentou maior expressão desta proteína quando infectado com o patógeno e na presença dos elicitores químicos, quando comparado com genótipo 'Catongo' submetido aos mesmos tratamentos, que teve o acúmulo desta proteína reduzido (Figura 7).

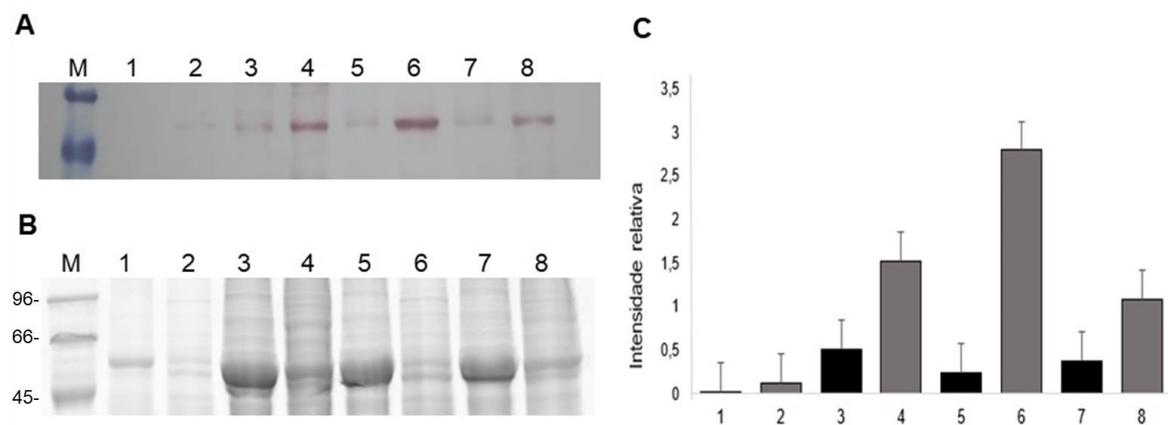


Figura 7 - (A) Identificação da Proteína de ligação (Bip) por meio do *Western Blot*. (M) marcador molecular, (1) controle ['Catongo' (Cat)], (2) controle (CCN 51), (3) tratamento infectado com *M. perniciosa* + sacarose ['Catongo' (Cat)], (4) tratamento infectado com *M. perniciosa* + sacarose (CCN51), (5) tratamento infectado com *M. perniciosa* + glicose ['Catongo' (Cat)], (6) tratamento infectado com *M. perniciosa* + glicose (CCN 51), (7) tratamento infectado com *M. perniciosa* + ácido salicílico ['Catongo' (Cat)] e (8) tratamento infectado com *M. perniciosa* + ácido salicílico (CCN 51). Genótipo de *T. cacao* 'Catongo' ■, intolerante ao fungo *M. perniciosa* e genótipo de *T. cacao* CCN 51 □, tolerante ao fungo *M. perniciosa*. **(B)** Gel SDS-PAGE. **(C)** Houve expressão em intensidade de bandas nos tratamentos em relação aos controles.

4.3. ANÁLISE PROTEÔMICA

4.3.1. Perfil proteico em SDS-PAGE

O perfil proteômico foliar em SDS-PAGE dos genótipos de *T. cacao* CCN 51 e 'Catongo', tolerante e intolerante a *M. perniciosa*, respectivamente, mostrou bandas bem definidas, bem separadas, sem apresentação de arrasto, confirmando uma boa extração proteica (Figura 8). O rendimento proteico das amostras foliares, de plântulas infectadas com *M. perniciosa* e infectadas com *M. perniciosa* e elicidadas com sacarose, glicose e ácido salicílico, de ambos os genótipos, foram ajustados para 4 µg/µL. Ao observar os perfis em SDS-PAGE, avaliou-se que os tratamentos infectados e elicitados de ambos os genótipos mostraram um acúmulo de proteínas por todo o gel, evidenciando uma distribuição nas faixas de 14 a 97 kDa em comparação aos seus respectivos controles. Desta forma, os perfis proteicos se diferenciaram na intensidade de bandas.

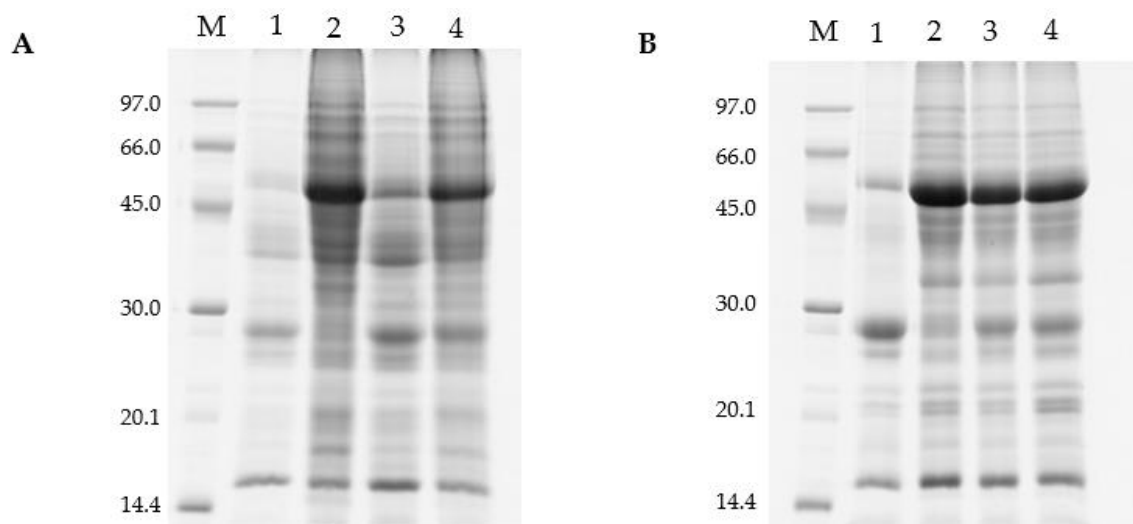


Figura 8 - Mini SDS-PAGE (M) marcador molecular, (1) controle, (2) tratamento com sacarose, (3) tratamento com glicose e (4) tratamento com ácido salicílico. **(A)** genótipo de *T. cacao* CCN 51, tolerante ao fungo *M. perniciosa*, **(B)** genótipo de *T. cacao* 'Catongo' intolerante ao fungo *M. perniciosa*.

4.3.2. Perfil proteico em eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

Ao confirmar a eficiência da extração de proteínas das amostras foliares a partir do SDS-PAGE, realizou-se a separação dos perfis proteicos das amostras em triplicatas de gel bidimensional, utilizando uma massa final de 350 µg de proteínas por gel (Figura 9 e 10). As proteínas foram separadas por pontos isoelétricos e por peso molecular. Os géis apresentaram a presença de poucos arrastes, constatando que os *spots* foram bem focalizados. As triplicatas foram feitas com a finalidade de verificar a reprodutibilidade das amostras na análise realizada por meio do software *Image Master 2D Platinum 7.0* (GE USA).

Ao analisar os géis, constatou-se para o genótipo 'Catongo' a presença de um total de 109 *spots* no controle infectado com *M. perniciosa* na ausência de glicose e um total de 243 *spots* para o tratamento infectado com *M. perniciosa* na presença de glicose (Figura 11, A). Houve uma maior distribuição e detecção de *spots* nos géis do tratamento de glicose na presença do patógeno, em comparação ao controle. Além disso, 66 *spots* foram diferencialmente acumulados tanto no controle como no tratamento com o elicitor e o patógeno, sendo que 43 do total de *spots* foram detectados apenas no controle, enquanto no tratamento de glicose com o patógeno foram detectados 177 *spots*. Para o genótipo CCN 51, verificou-se um total de 230

spots para o tratamento controle e 219 *spots* para o tratamento de glicose na presença do patógeno. Deste total, 99 *spots* foram diferencialmente acumulados tanto no controle como no tratamento envolvendo o elicitor e o patógeno, ao passo que 131 *spots* foram detectados apenas no controle e 120 detectados no tratamento envolvendo o elicitor e o fungo (Figura 11, B).

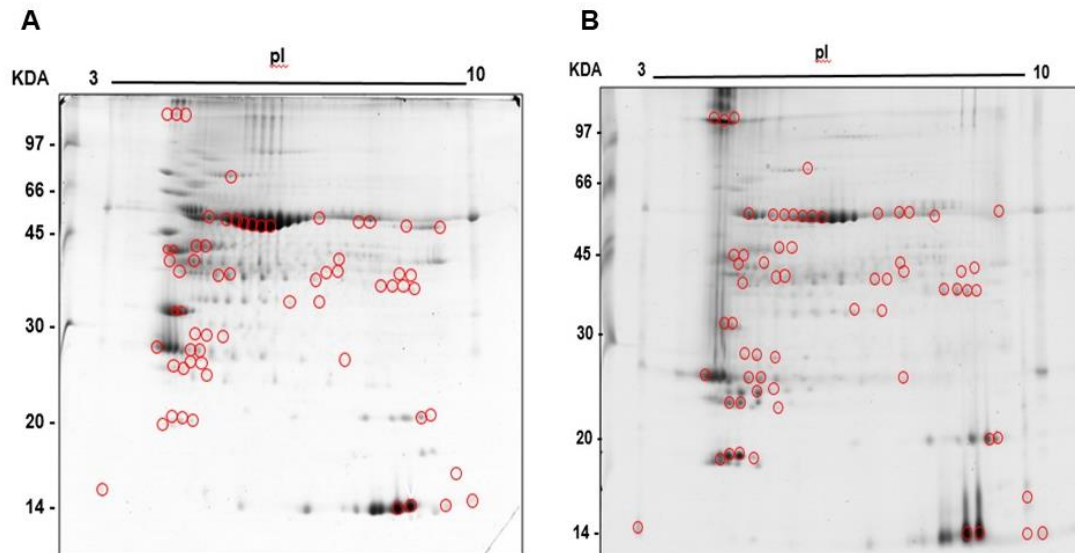


Figura 9 - Perfil proteico de amostras foliares do genótipo de *T. cacao* ('Catongo') em 2D-PAGE. (A) (infestado = controle) e em (B) (infestado + glicose = tratamento). As amostras foram focalizadas em *strips* de 13 cm com pH 3-10 não linear (NL). Os géis foram corados com azul de coomassie coloidal (Neuhoff et al., 1988).

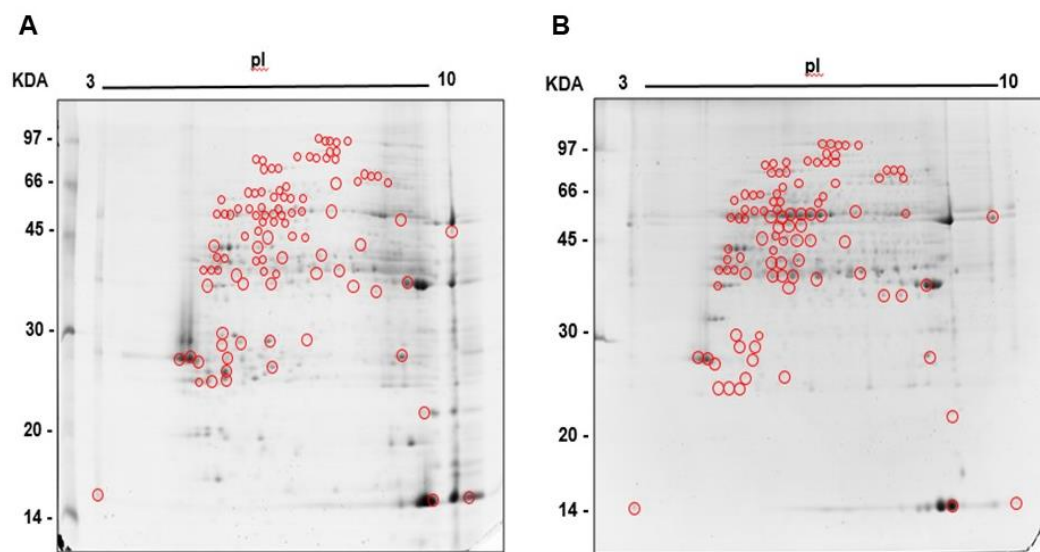


Figura 10 - Perfil proteico de amostras foliares do genótipo de *T. cacao* CCN 51 em 2D-PAGE. (A) (infetado = controle) e (B) (infetado + glicose = tratamento). As amostras foram focalizadas em *strips* de 13 cm com pH 3-10 não linear (NL). Os géis foram corados com azul de coomassie coloidal (Neuhoff et al.,1988).

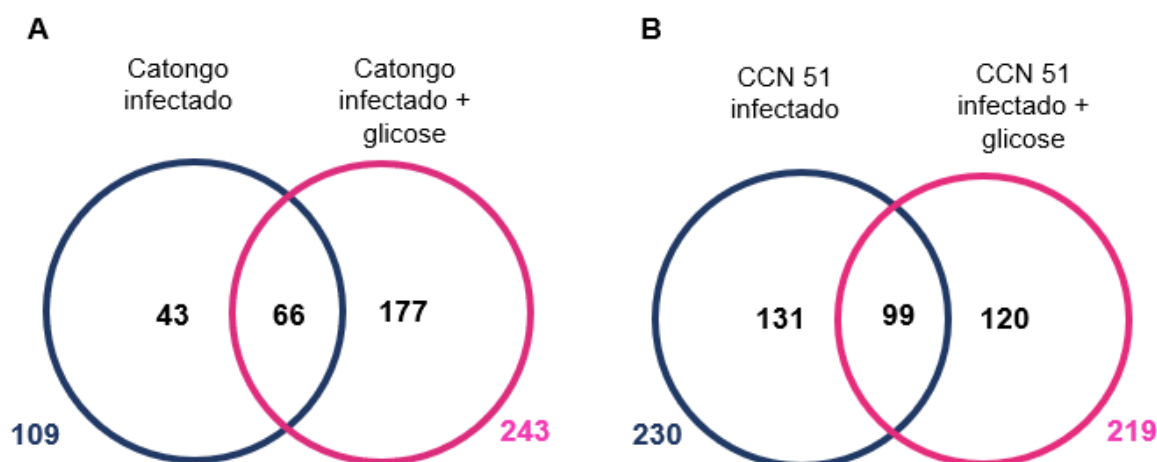


Figura 11 - Diagrama de Venn mostrando o número de *spots* obtidos de proteínas acumuladas e diferencialmente acumuladas, em folhas de dois genótipos de *T. cacao*, infectados com *M. perniciosa*, na ausência e na presença de glicose.

4.3.3. Distribuição de *spots* proteicos de acordo com a massa molecular (MM) e o ponto isoelétrico (PI)

A avaliação da distribuição dos *spots* proteicos referentes a MM e a PI foi realizada em todos os tratamentos de ambos os genótipos de *T. cacao*. Tanto para o genótipo 'Catongo' quanto para o CCN 51, houve maior acúmulo de proteínas nos

tratamentos infectado com *M. pernicioso* na presença de glicose, cujos valores de MM variaram de 30 a 97 kDa, diferentemente dos seus respectivos controles infectado com *M. pernicioso* na ausência de glicose (Figura 12 e 13). Além disso, observou-se, também, maior acúmulo de proteínas com MM até 30 kDa no controle do genótipo CCN 51 (tolerante) quando comparado com o genótipo 'Catongo' (intolerante).

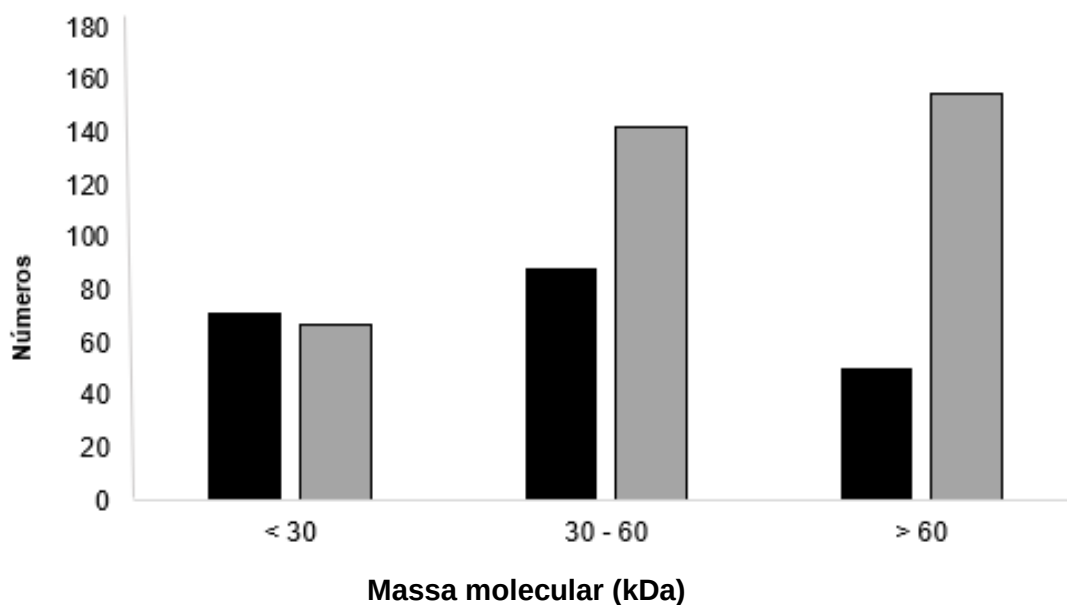


Figura 12 - Distribuição de *spots* proteicos detectados nos mapas 2-D, de acordo com a massa molecular (kDa), em folhas de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* 'Catongo', infectadas com *M. pernicioso*, na ausência ■ e na presença ■ de glicose.

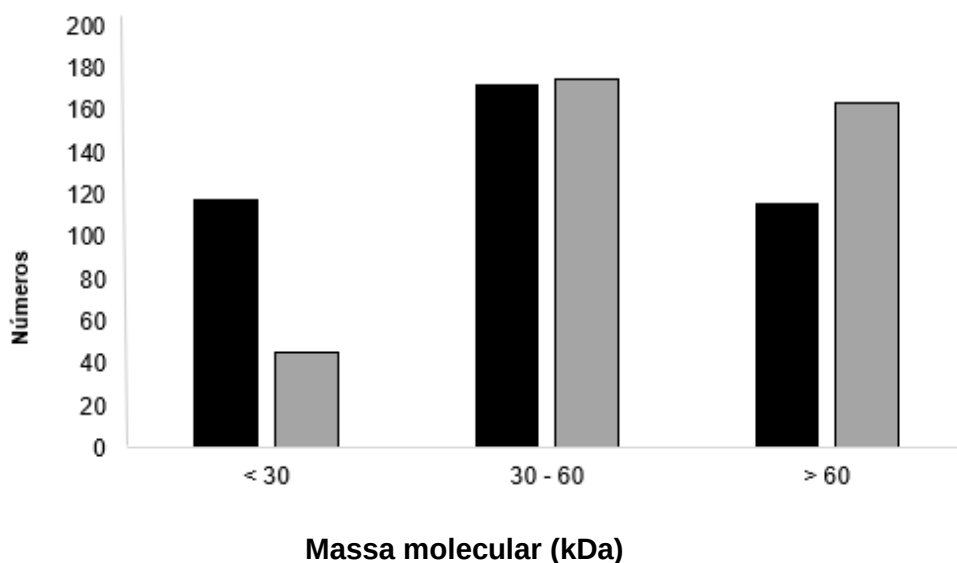


Figura 13 - Distribuição de *spots* proteicos detectados nos mapas 2-D, de acordo com a massa molecular (kDa), em folhas de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* CCN 51, infectadas com *M. pernicioso*, na ausência ■ e na presença ■ de glicose.

Ao analisar o ponto isoelétrico (PI) das proteínas distribuídas nos géis 2D de ambos os genótipos de *T. cacao*, observou-se que houve uma menor quantidade de proteínas com PI abaixo de 4. Ao realizar uma comparação intragenotípica entre os tratamentos infectados com o patógeno na presença e ausência do elicitor, verificou-se, para o genótipo ‘Catongo’, uma maior quantidade de proteínas no tratamento infectado com *M. pernicioso* na presença e ausência de glicose para todos os pontos isoelétricos (Figura 14). Por outro lado, para o genótipo CCN 51, houve uma distribuição entre o tratamento infectado com *M. pernicioso* na presença de glicose e o controle infectado com *M. pernicioso* na ausência de glicose, sendo que proteínas com pH de 4 a 8 foram detectadas no tratamento. Em contrapartida, houve um aumento nos valores de PI de 3 a 4 e de 8 a 10 no controle (Figura 15).

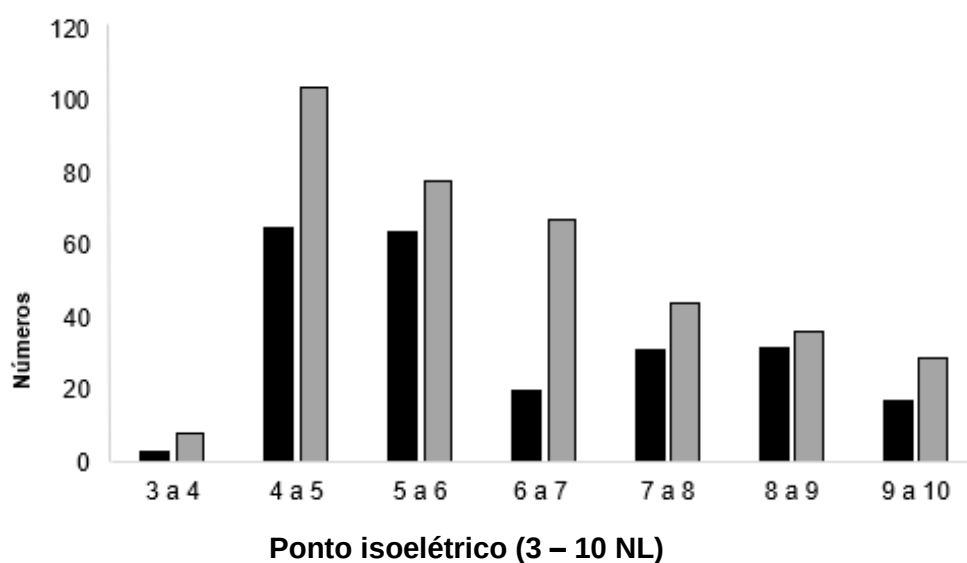


Figura 14 - Distribuição de *spots* proteicos detectados nos mapas 2-D, de acordo com o ponto isoelétrico, em folhas de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* 'Catongo', infectadas com *M. pernicioso*, na ausência ■ e na presença □ e glicose.

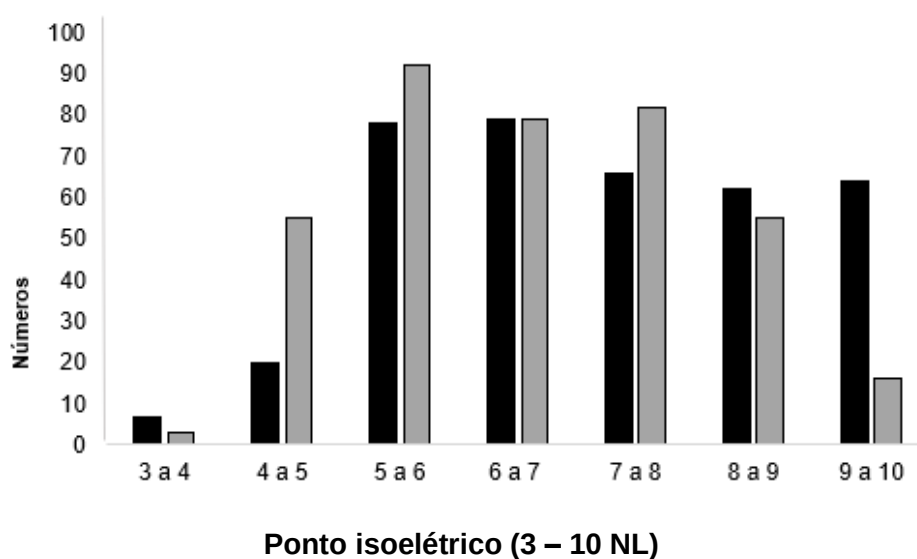


Figura 15 - Distribuição de *spots* proteicos detectados nos mapas 2-D, de acordo com o ponto isoelétrico, em folhas de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* CCN 51, infectadas com *M. pernicioso*, na ausência ■ e na presença □ de glicose.

4.3.4. Identificação de proteínas diferencialmente acumuladas

Os géis 2D em triplicatas de ambos os genótipos de *T. cacao* infectados na presença e ausência de glicose (controle) foram analisados no *Image Master 7.0* (valor de ANOVA com $p < 0,05$ e Fold > 1,5), com o objetivo de realizar a identificação

dos *spots* diferencialmente acumulados. A partir das análises do programa, seguidas de algumas modificações manuais, detectou-se, para o genótipo Catongo, um total de 352 *spots* (diferencialmente acumulados e acumulados apenas em um tratamento). Em contrapartida, para o genótipo CCN 51, foram detectados 449 *spots* (diferencialmente acumulados e acumulados apenas em um tratamento).

No gel do genótipo 'Catongo' foram excisados 66 *spots* e do CCN 51 99 *spots* relacionados às proteínas diferencialmente acumuladas entre controle e o tratamento infectado com o patógeno na presença de glicose. Após, foi realizada a identificação desses *spots*, por espectrometria de massas (MS/MS), inferindo informações sobre a influência da glicose no aumento de detecção ou não de proteínas e no metabolismo das plantas. Foram identificadas, por espectrometria de massas, 37 proteínas diferencialmente acumuladas nas folhas para o genótipo 'Catongo' (Tabela 2) e 52 proteínas diferencialmente acumuladas para o genótipo CCN 51 (Tabela 3). As proteínas identificadas apresentaram homologia com sequências proteicas encontradas no banco de dados do NCBI nr, por meio da ferramenta Mascot (<http://www.matrixscience.com>).

Tabela 2 - Proteínas diferencialmente acumuladas, identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) em folhas do genótipo de *T. cacao* 'Catongo', infectadas com *M. pernicioso*, na ausência e na presença de glicose.

spot	Accession	Protein ID	MM Kda ¹	pI ²	N. peptides ³	Score ⁴	Fold Change ⁵
1	GBLPA_ARATH	Receptor for activated C kinase 1A OS	36124	7.62	6	141	1,9
8	EOX97859.1	Fructose-bisphosphate aldolase 1	43279	8.43	8	695	2,0
17	EOY18135.1	Triosephosphate isomerase isoform 1	32446	8.05	2	188	5,2
19	EOY11131.1	DNA-damage-repair/toleration protein (DRT102)	34891	5.18	7	328	3,2
31	KHG19313.1	Proteasome subunit beta type-2-A -like protein	22648	5.85	2	136	1,7
34	RPOB_SORC5	DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS	155291	5.4	1	48	1,5
36	SODCP_PETHY	Superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplastic OS	22418	6.17	3	66	2,2
39	EOY02403.1	Carbonic anhydrase 1 isoform 2	35284	8.35	17	854	7,6
42	BCA3_ARATH	Beta carbonic anhydrase 3 OS	29217	6.54	3	100	3,5
44	TCPQ_ARATH	Complex protein 1 subunit theta OS	59472	5.25	3	60	5,3
45	EOX93083.1	Photosystem II subunit P-1	26979	8.65	7	596	6,3
46	FTSH2_ORYSJ	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 2, chloroplastic OS	72607	5.54	28	555	2,0
52	XP_017978306.1	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplastic	46018	9.02	6	420	2,4
53	EOY14797.1	Isoflavone reductase-like protein 4 isoform 1	34864	6.16	11	918	2,0
55	PST2_GOSHI	Photosystem II 5 kDa protein, chloroplastic	11173	10.37	4	55	4,3
56	EOX97285.1	Malate dehydrogenase isoform 1	41725	9.00	10	592	3,4
57	AGL10062.1	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (plastid)	40855	6.57	1	64	4,6
59	RNS6_PYRPY	Ribonuclease S-6 OS	26783	9.17	15	72	3,0
83	AAM55983.1	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast)	47796	6.97	3	195	2,9
89	CPNB3_ARATH	Chaperonin 60 subunit beta 3, chloroplastic OS	63627	5.73	19	552	1,8
93	XP_007033270.1	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain, chloroplastic	21174	9.22	10	349	2,5
101	XP_007026083.1	ATP synthase gamma chain, chloroplastic	41685	5.57	14	708	1,8
103	RRF_SACD2	Ribosome-recycling factor OS=Saccharophagus degradans	20655	5.59	13	54	2,9
107	EOX93083.1	Photosystem II subunit P-1	28666	8.65	5	438	2,7
110	BAS1_ORYSJ	2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic OS	28311	5.67	8	183	7,0
116	AGB05600.1	Fructose-bisphosphate aldolase 3	43094	8.44	5	296	1,9
117	EOY16613.1	Alcohol dehydrogenase 1 isoform 1	42553	6.56	6	324	3,9
124	GCST_PEA	Aminomethyltransferase, mitochondrial OS	44257	8.79	2	106	2,3

125	RPOK_METAC	DNA-directed RNA polymerase subunit K OS	6615	9.86	6	70	2,5
128	XP_017980600.1	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic	51447	8.49	7	522	6,3
136	CH60A_ARATH	Chaperonin CPN60, mitochondrial OS	61584	5.66	6	45	8,7
140	EOX91867.1	Serine transhydroxymethyltransferase 1 isoform 2	47274	9.01	7	494	2,2
143	ATPB_EUCGG	ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS	53752	5.29	103	3202	8,4
144	Q9XQJ6.1	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	52553	6.24	6	426	1,6
151	EOY20678.1	Aldehyde dehydrogenase family 2 member B4	62275	7.63	8	506	2,5
156	KHG20119.1	Triosephosphate isomerase, cytosolic	18362	5.63	3	162	2,4
157	ARGI1_ARATH	Arginase 1, mitochondrial OS	37549	6.11	8	146	2,0

¹MM, corresponde aos valores de massa molecular (kDa);

²pI ao ponto isoeletrico estimados pelo programa Image Master 2D Platinum 7.0;

³Números de peptídeos;

⁴Score corresponde ao valor da cobertura calculada pelo Mascot;

⁵Fold corresponde a comparação do nível de acúmulo da proteína entre o 2D-PAGE do controle (infectado com *M. perniciosus* na ausência de glicose) e do tratamento (infectado com *M. perniciosus* na presença de glicose). Fold >1,5

Tabela 3 - Proteínas diferencialmente acumuladas, identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) em folhas do genótipo de *T. cacao* CCN 51, infectadas com *M. pernicioso*, na ausência e na presença de glicose.

spot	Accession	Protein ID	MM Kda ¹	pI ²	N. peptides ³	Score ⁴	Fold change ⁵
2	ATPA_GOSHI	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic OS	55437	5.25	19	567	7,9
5	XP_017974137.1	2-methylene-furan-3-one reductase	34118	5.71	6	498	3,3
7	EOX96247.1	Transketolase	81006	6.34	18	967	4,2
8	ATPA_AMBTC	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic OS	55387	5.25	3	118	5,6
9	MDHG_CUCSA	Malate dehydrogenase, glyoxysomal OS	38057	8.82	15	241	6,6
17	EOY03621.1	Insulinase (Peptidase family M16) protein isoform 1	59199	6.49	4	246	1,9
19	GLNA4_PHAVU	Glutamine synthetase leaf isozyme, chloroplastic OS	47502	6.67	5	61	2,8
21	EOX98378.1	Plant basic secretory protein (BSP) family protein, putative	9540	5.77	1	42	4,7
22	KHG19313.1	Proteasome subunit beta type-2-A -like protein	22648	5.85	2	136	5,4
25	RADL3_ARATH	Protein RADIALIS-like 3 OS	9357	8.15	1	43	2,0
26	P2SAF_ORYSJ	Photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplastic OS	45498	9.02	17	690	7,9
29	GCST_PEA	Aminomethyltransferase, mitochondrial OS	44257	8.79	2	106	2,2
30	XP_017971644.1	Glutamate--glyoxylate aminotransferase 2 isoform X1	53956	5.68	11	536	3,2
31	RUBB_PEA	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic OS	53809	5.29	8	145	2,5
32	Q9XQJ6.1	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	52553	6.24	6	426	4,3
34	UVRC_CLOK5	UvrABC system protein C OS	9357	8.15	1	42	2,3
49	GGT1_ARATH	Glutamate--glyoxylate aminotransferase 1 OS	53780	6.49	3	69	4,4
51	CAC87366.1	Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase, partial (chloroplast)	52398	6.22	22	890	3,2
57	EOY04195.1	Ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein isoform1	21647	9.22	8	324	4,2
63	EOX93083.1	Photosystem II subunit P-1	28666	8.65	22	871	5,6
65	EOX93083.1	Photosystem II subunit P-1	26979	8.65	7	596	10,3
66	EOY07495.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein isoform 1	36499	9.29	3	230	6,2
73	KRH00323.1	Hypothetical protein GLYMA_18G206200	24596	5.91	1	73	1,8
74	RRF_SACD2	Ribosome-recycling factor OS=Saccharophagus degradans	20655	5.59	13	54	2,2
75	BCA3_ARATH	Beta carbonic anhydrase 3 OS	29217	6.54	3	100	3,1
77	XP_017985378.1	Uncharacterized protein LOC18593551	29924	5.84	6	388	2,0
79	G3P_PHARH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS	36288	5.79	2	82	4,7
80	ATPB_COFAR	ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS	53690	5.36	2	52	2,5
81	CBI23176.3	Unnamed protein product, partial	36471	5.53	6	239	4,7
84	EOY14797.1	Isoflavone reductase-like protein 4 isoform 1	34864	6.16	11	918	1,9
85	EOX97285.1	Malate dehydrogenase isoform 1	41725	9.00	10	592	1,6

96	GME_ARATH	GDP-mannose 3,5-epimerase OS	43130	5.85	7	157	2,5
108	EOY06834.1	Mitochondrial lipoamide dehydrogenase 1	54234	7.23	10	757	3,2
115	EOY26303.1	Vacuolar ATP synthase subunit A isoform 1	73558	5.64	14	1060	2,5
116	HSP7E_ARATH	Heat shock 70 kDa protein 5 OS	70870	5.3	2	84	3,0
122	EOY08233.1	Tubulin/FtsZ family protein isoform 1	50847	5.66	4	309	1,8
123	EOX97859.1	Fructose-bisphosphate aldolase 1	43279	8.43	7	485	2,4
128	PSBO_SOLTU	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic OS	35595	5.84	3	75	1,6
129	AGL10062.1	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (plastid)	40855	6.57	1	64	1,8
136	MDHG_CUCSA	Malate dehydrogenase, glyoxysomal OS	38057	8.82	15	241	2,3
137	AAB01121.1	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast)	53250	5.74	4	242	3,0
140	AGB05600.1	Fructose-bisphosphate aldolase 3	43094	8.44	5	296	4,3
152	RPOB_SORC5	DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS	155291	5.4	1	57	1,6
164	gi 78498932	High molecular weight glutenin, partial	977	10.99	18	65	3,4
176	RK34_CYAPA	50S ribosomal protein L34, cyanelle	5426	12.31	59	70	2,5
178	ATPB_ACRAL	ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS	53809	5.29	8	145	1,8
198	EOY17906.1	Sedoheptulose-bisphosphatase	42692	6.56	13	660	1,8
214	AAM55983.1	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast)	47796	6.97	3	195	2,1
232	RBL_SOLBU	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain OS	53397	6.55	21	406	1,6
243	EOX97859.1	Fructose-bisphosphate aldolase 1	43279	8.43	10	617	6,4
245	EOY00474.1	Quinone oxidoreductase-like protein isoform 1	40770	9.04	4	283	3,2
249	OIW02832.1	Hypothetical protein TanjilG_29608	28502	7.67	1	70	2,7

¹MM, corresponde aos valores de massa molecular (kDa);

²pl ao ponto isoelétrico estimados pelo programa Image Master 2D Platinum 7.0;

³Números de peptídeos;

⁴Score corresponde ao valor da cobertura calculada pelo Mascot;

⁵Fold corresponde a comparação do nível de acúmulo da proteína entre o 2D-PAGE do controle (infectado com *M. perniciosus* na ausência de glicose) e do tratamento (infectado com *M. perniciosus* na presença de glicose). Fold >1,5

4.3.5. Categorização funcional das proteínas de acordo com a ontologia do gene

A classificação funcional das proteínas diferencialmente acumuladas, identificadas nas folhas das plantas jovens dos genótipos de *T. cacao* 'Catongo' e CCN 51, foi realizada de acordo com suas funções e processos biológicos, com análises do *Gene Ontology* pelo software *Blast2GO* e classificadas em quatro grandes grupos. A maioria das proteínas identificadas do genótipo 'Catongo' está relacionada aos processos metabólicos celulares (biossíntese e catabolismo) (43%), outras aos processos fotossintéticos (30%), processo de oxirredução (11%) e respostas de defesa e estresse (16%) (Figura 16). Das 16 proteínas ligadas ao processo metabólico, a aldolase da frutose-bisfosfato (*spot* 8) e a desidrogenase do malato (*spot* 56) estão associadas ao metabolismo energético das plantas. A maioria das proteínas encontradas, relacionadas aos processos fotossintéticos, foi a enzima Rubisco (*spot* 57, *spot* 83, *spot* 93 e *spot* 144) e ATPases (*spot* 46, *spot* 101 e *spot* 143). Além disso, foram analisadas, também, proteínas envolvidas no estresse oxidativo, como a dismutase do superóxido (*spot* 36) e as chaperoninas como resposta ao estresse (*spot* 89 e *spot* 136).

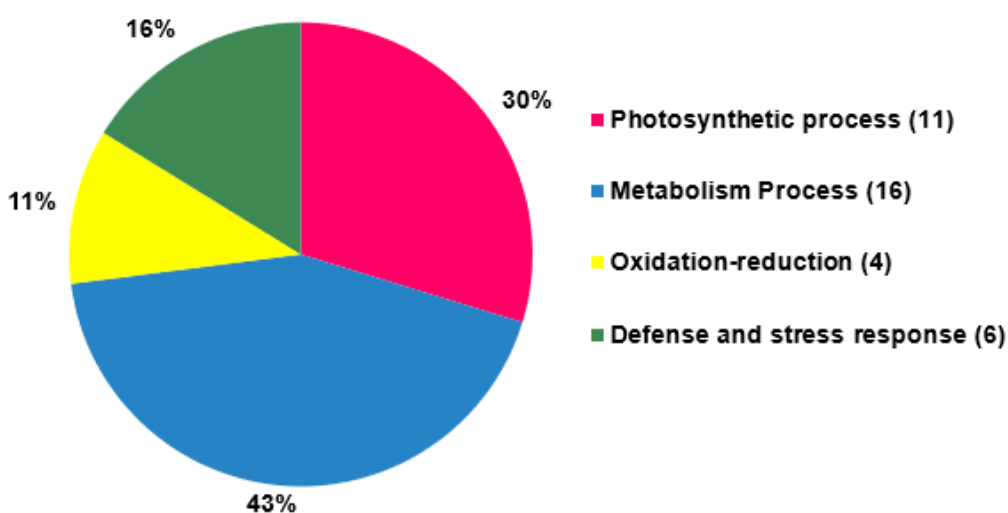


Figura 16 - 37 Proteínas diferencialmente acumuladas identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) em folhas de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* 'Catongo', infectadas com *M. pernicioso*, na ausência e na presença de glicose, em relação a sua função molecular no processo biológico.

Foi realizada, também, a classificação das proteínas foliares do genótipo Catongo, tolerantes ao *M. pernicioso*, com base na sua localização celular. Verificou-se que 27% das proteínas identificadas fazem parte de compartimentos celulares distintos, enquanto outras 27% estão localizadas dentro das células. Aproximadamente, 22% são proteínas transmembranas capazes de atravessar a bicamada lipídica, transportando íons e água, 16% estão presentes no interior da membrana plasmática e 8% localizadas em partes da membrana, seja interna ou externa (Figura 17).

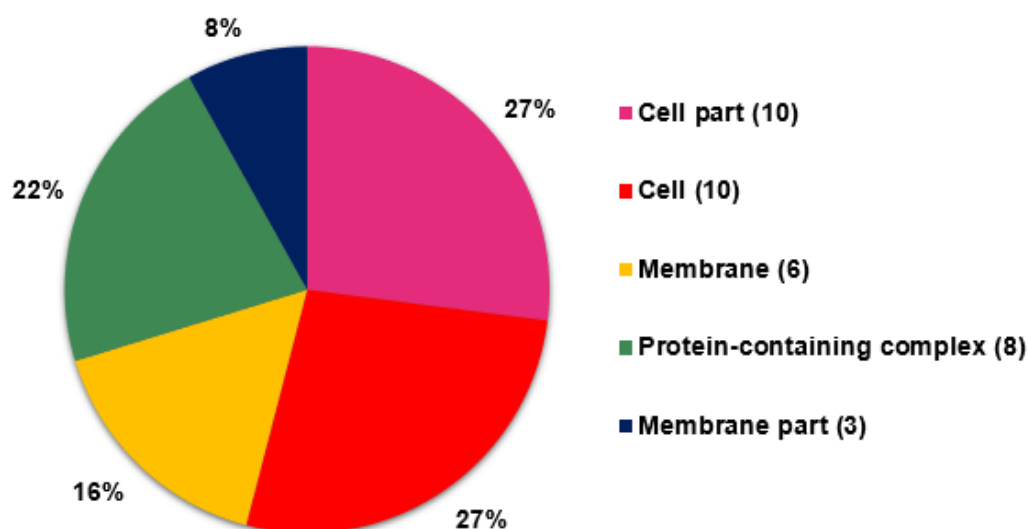


Figura 17 - 37 Proteínas diferencialmente acumuladas identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) em folhas de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* 'Catongo', inoculadas com *M. pernicioso*, na ausência e na presença de glicose, em relação à localização celular.

Nas folhas do genótipo tolerante ao fungo *M. pernicioso* (CCN 51) foram encontradas proteínas envolvidas nos processos fotossintéticos (30,8%), proteínas relacionadas aos processos metabólicos celulares (28,8%) e proteínas atuantes no processo de oxirredução (7,7%). Além disso, foram identificadas, também, proteínas referentes à defesa e ao estresse (5,8%) (Figura 18). Destacamos a Rubisco (*spot* 31, *spot* 32, *spot* 129, *spot* 214 e 232), como uma das proteínas encontradas em maior quantidade nas folhas, juntamente com e as ATPases (*spot* 2, *spot* 8, *spot* 80 e 178), proteínas que desempenham papel fundamental na respiração celular e fonte de energia para as plantas. Entre as proteínas referentes ao metabolismo energético, citamos as desidrogenase do malato (*spot* 9, *spot* 85 e 136) e as aminotransferase do glutamato-glioxilato (*spot* 49). Além disso, foram também constatadas proteínas ligadas a oxirredução, como as proteínas de choque térmico (*spot* 116) e as atuantes nas respostas de defesa (*spot* 22, *spot* 51 e 57).

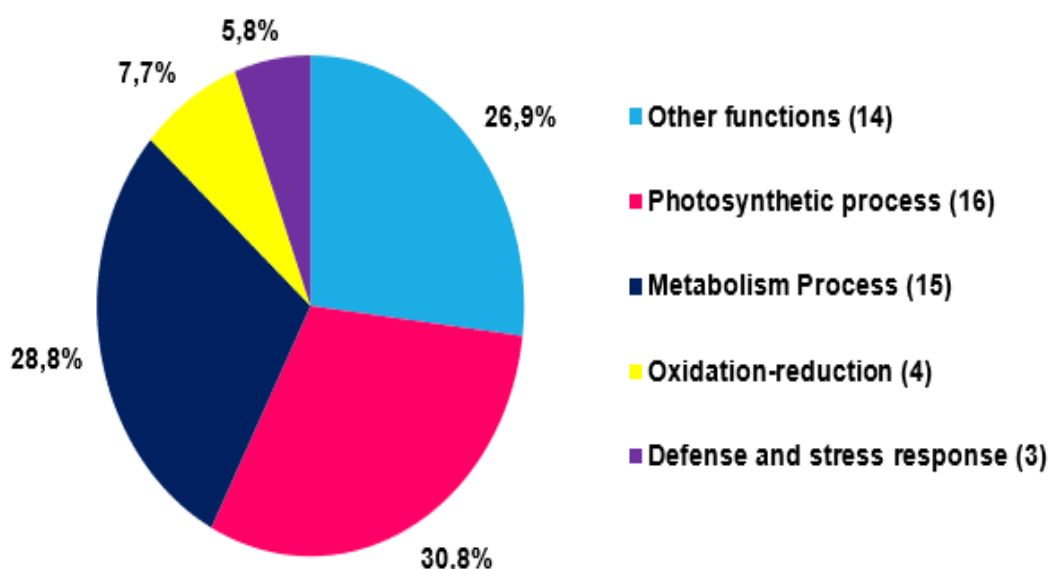


Figura 18 - 52 Proteínas diferencialmente acumuladas identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) em folhas de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* CCN 51, infectadas com *M. pernicioso*, na ausência e na presença de glicose, em relação a sua função molecular no processo biológico.

Realizou-se a categorização das proteínas foliares do genótipo de *T. cacao* CCN 51 de acordo com a sua compartimentalização celular e com locais em que estão localizadas nas células. Observou-se que 23% das proteínas estão presentes em partes da célula, 23% são proteínas transmembranas ou intrínsecas, as quais estão ligadas a canais de água ou íons, 22% estão localizadas no interior das células, outros 15% se encontram nas superfícies externas ou internas da membrana, 15% estão localizadas na membrana plasmática e 2% nos organelos celulares (Figura 19).

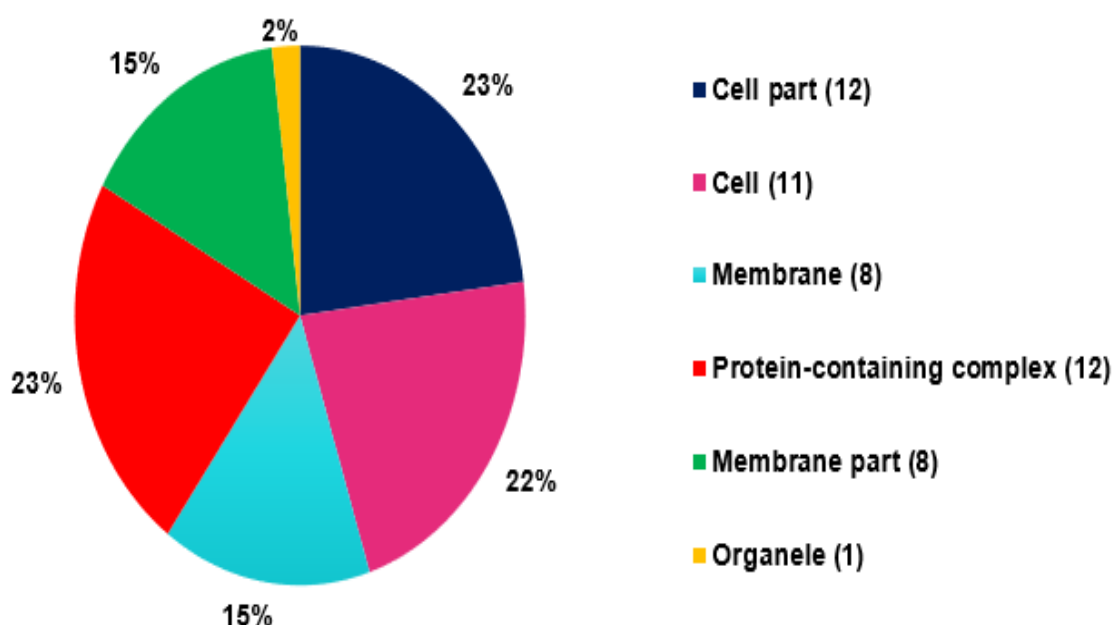


Figura 19 - 52 Proteínas diferencialmente acumuladas identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) em folhas de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* CCN 51, infectadas com *M. pernicioso*, na ausência e na presença de glicose, em relação a sua localização celular.

4.3.6. Gráficos *Heat maps* das proteínas diferencialmente acumuladas, de acordo com maior (*UP regulation*) e menor expressão (*Down regulation*)

A análise dos gráficos *heat maps* das proteínas foliares dos genótipos de *T. cacao* 'Catongo' e CCN 51 permitiu identificar aquelas proteínas que apresentaram maior e menor expressão nos controles e tratamentos. Observou-se, para as folhas do genótipo 'Catongo', que as proteínas envolvidas no processo metabólico apresentaram diferenças de expressão. Algumas destas proteínas, como a desidrogenase alcoólica, quinase do fosfoglicerato, subunidade da RNA polimerase, aldolase da fructose-bifosfato e aminotransferase e proteínas envolvidas no metabolismo energético, apresentaram elevada expressão no tratamento infectado com *M. pernicioso* na presença do elicitor glicose, quando comparado com o controle infectado na ausência do elicitor (Figura 20). Ainda assim, nas folhas do genótipo CCN 51, a maioria das proteínas apresentou expressão diferencial no tratamento infectado com o patógeno na presença de glicose, em comparação ao controle infectado na ausência do elicitor. Proteínas importantes como a subunidade da polimerase do RNA, aldolase da frutose-bisfosfato, aminotransferase e desidrogenase do malato apresentaram maior expressão no tratamento infectado com *M. pernicioso* na presença de glicose em relação ao seu controle infectado com *M. pernicioso* na ausência de glicose (Figura 21).

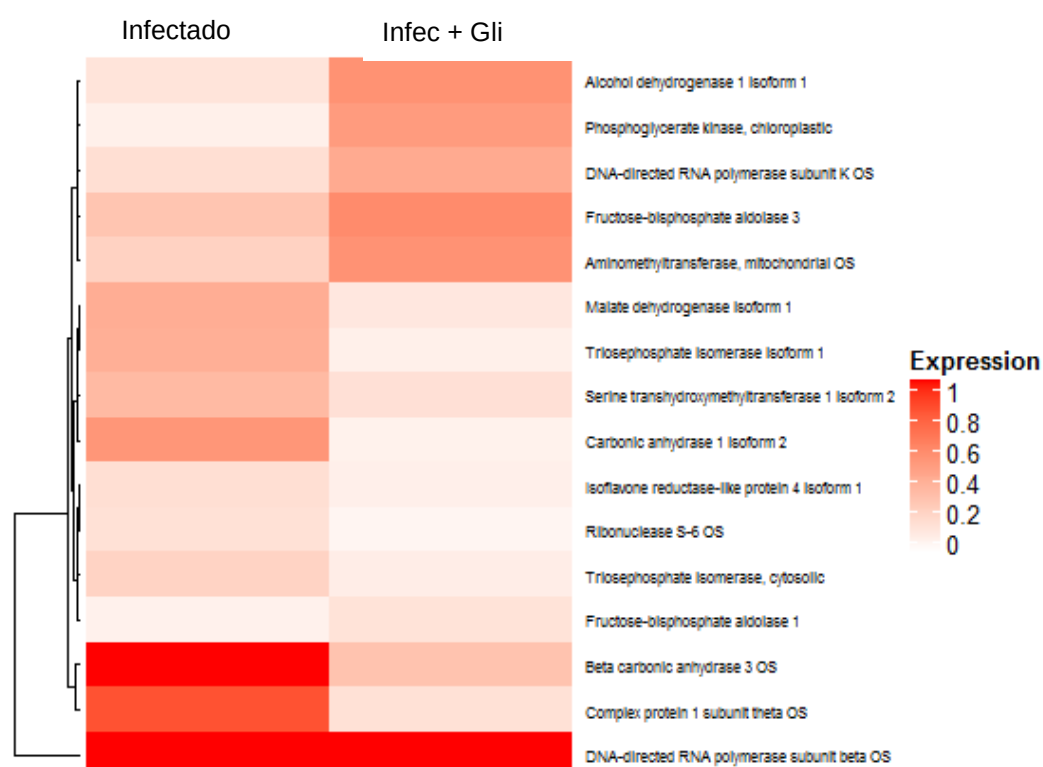


Figura 20 - Gráfico *heat map* das proteínas diferencialmente acumuladas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* Catongo, infectado com *M. pernicioso*, na ausência (Infestado) e na presença de glicose (Infec + Gli), relacionadas aos processos metabólicos.

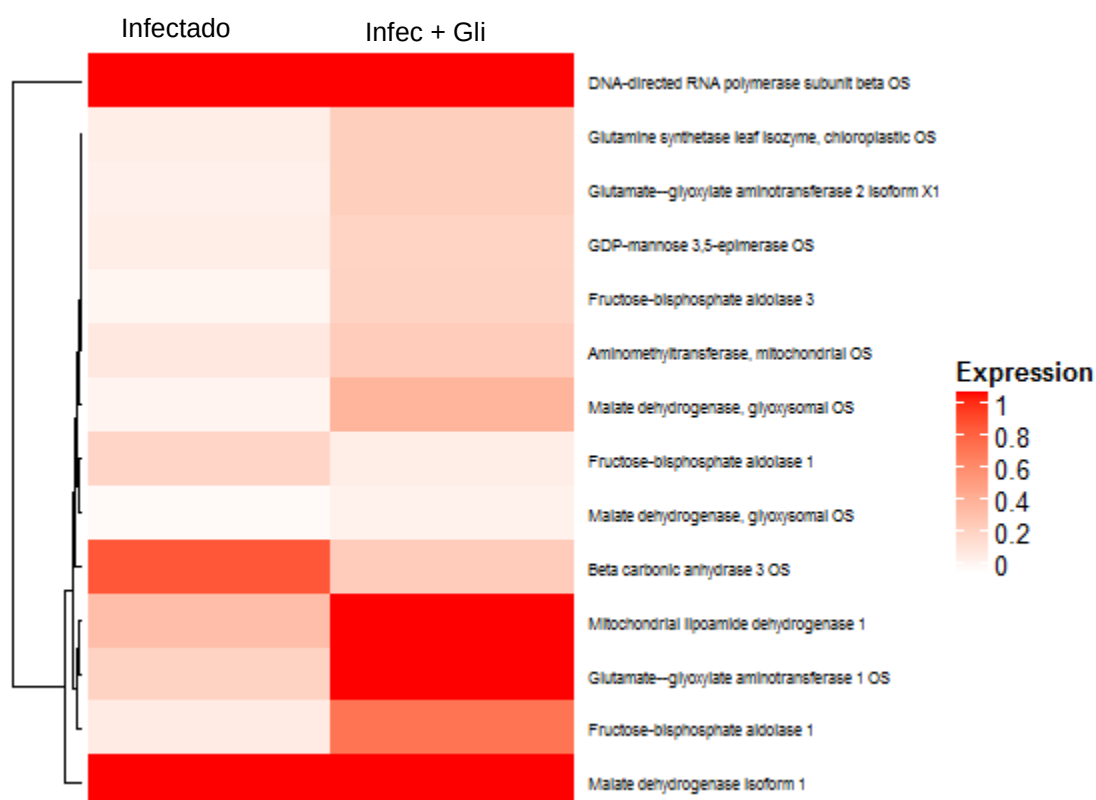


Figura 21 - Gráfico *heat map* das proteínas diferencialmente acumuladas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* CCN 51, infectado com *M. pernicioso*, na ausência (Infectado) e na presença de glicose (Infec +Gli), relacionadas aos processos metabólicos.

Sobre as proteínas associadas aos processos fotossintéticos, notou-se que grande parte das proteínas foliares do genótipo ‘Catongo’ apresentou maior acúmulo no controle (infectado com *M. pernicioso*), quando comparado com o tratamento infectado com *M. pernicioso* + glicose. Já proteínas como ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), da fase bioquímica da fotossíntese e a enzima sintase do ATP apresentaram maior expressão no tratamento infectado com *M. pernicioso* + glicose (Figura 22). Ao contrário do genótipo ‘Catongo’, no CCN 51 a maioria das proteínas apresentou maior acúmulo no tratamento infectado com o patógeno na presença do elicitor. Além disso, a proteína ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase/oxigenase foi detectada em maior quantidade e expressão. Também, foi detectada a enzima sintase do ATP subunidade α e β (Figura 23).

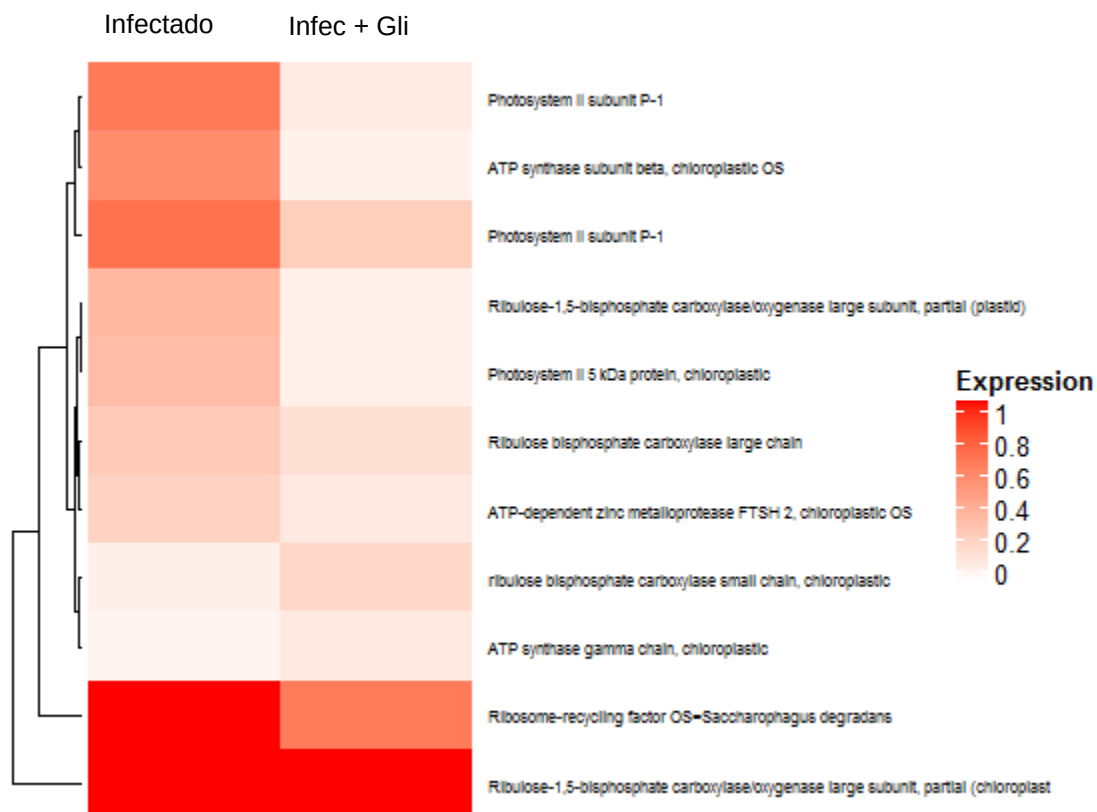


Figura 22 - Gráfico *heat map* das proteínas diferencialmente acumuladas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* 'Catongo', infectado com *M. pernicioso*, na ausência (Infectado) e na presença de glicose (Infec + Gli), relacionadas aos processos fotossintéticos.

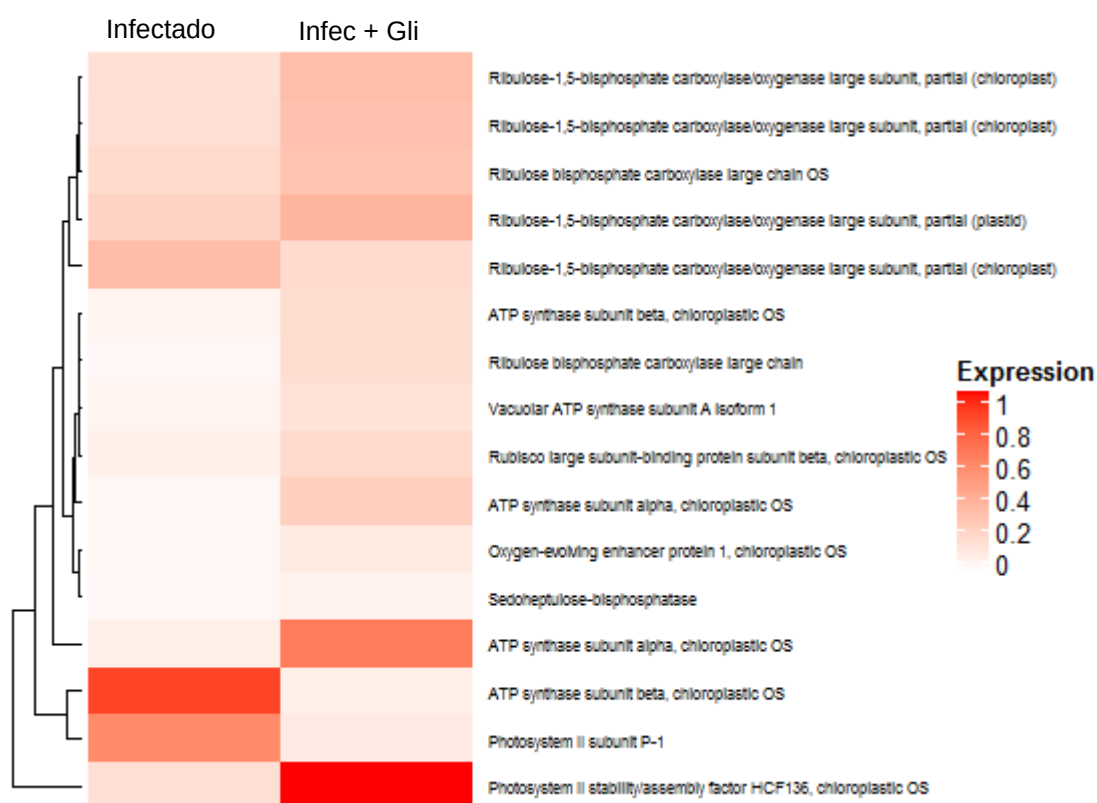


Figura 23 - Gráfico *heat Map* das proteínas diferencialmente acumuladas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* CCN 51, infectado com *M. pernicioso*, na ausência (Infecado) e na presença de glicose (Infec + Gli), relacionadas aos processos fotossintéticos.

Sobre o processo de oxirredução, no genótipo ‘Catongo’ as proteínas foliares identificadas apresentaram maior acúmulo no controle (infectado com *M. pernicioso*) em comparação com o tratamento infectado com *M. pernicioso* + glicose (Figura 24). Por outro lado, no genótipo tolerante ao *M. pernicioso* (CCN 51) as proteínas foliares apresentaram maior expressão no tratamento infectado com *M. pernicioso* + glicose (Figura 25).

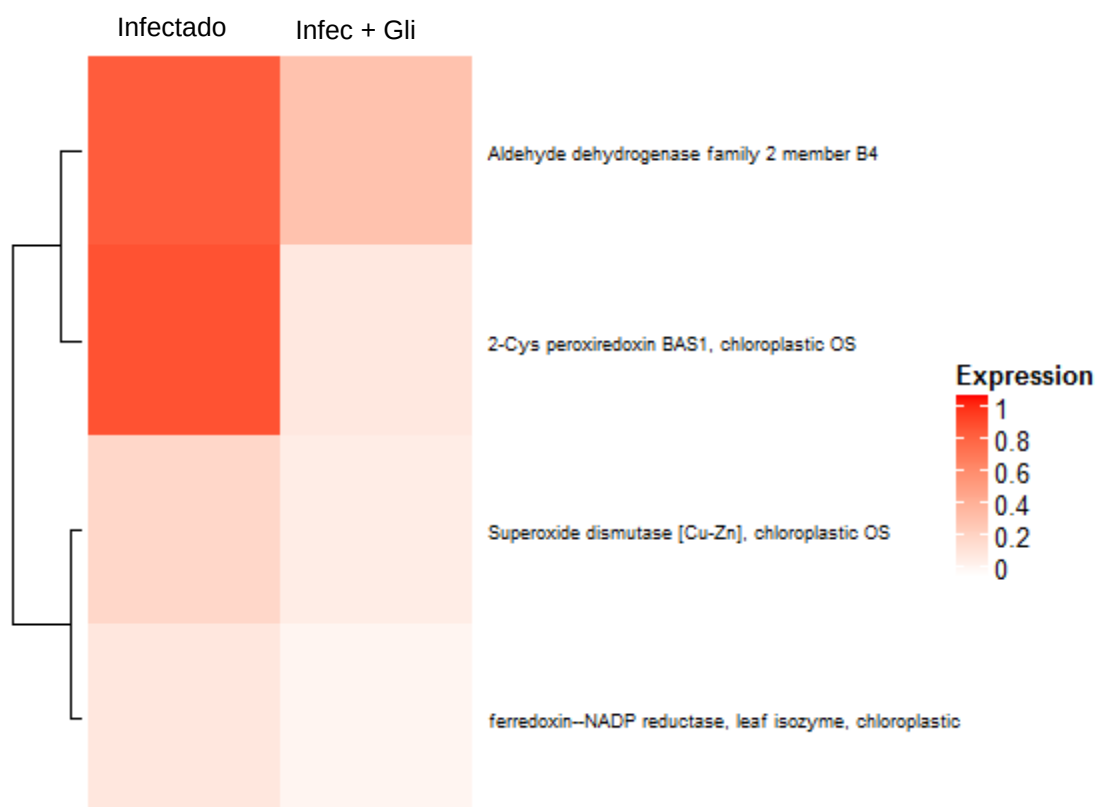


Figura 24 - Gráfico *heat map* das proteínas diferencialmente acumuladas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* 'Catongo', infectado com *M. pernicioso*, na ausência (Infectado) e na presença de glicose (Infec + Gli), relacionadas ao processo de oxirredução.

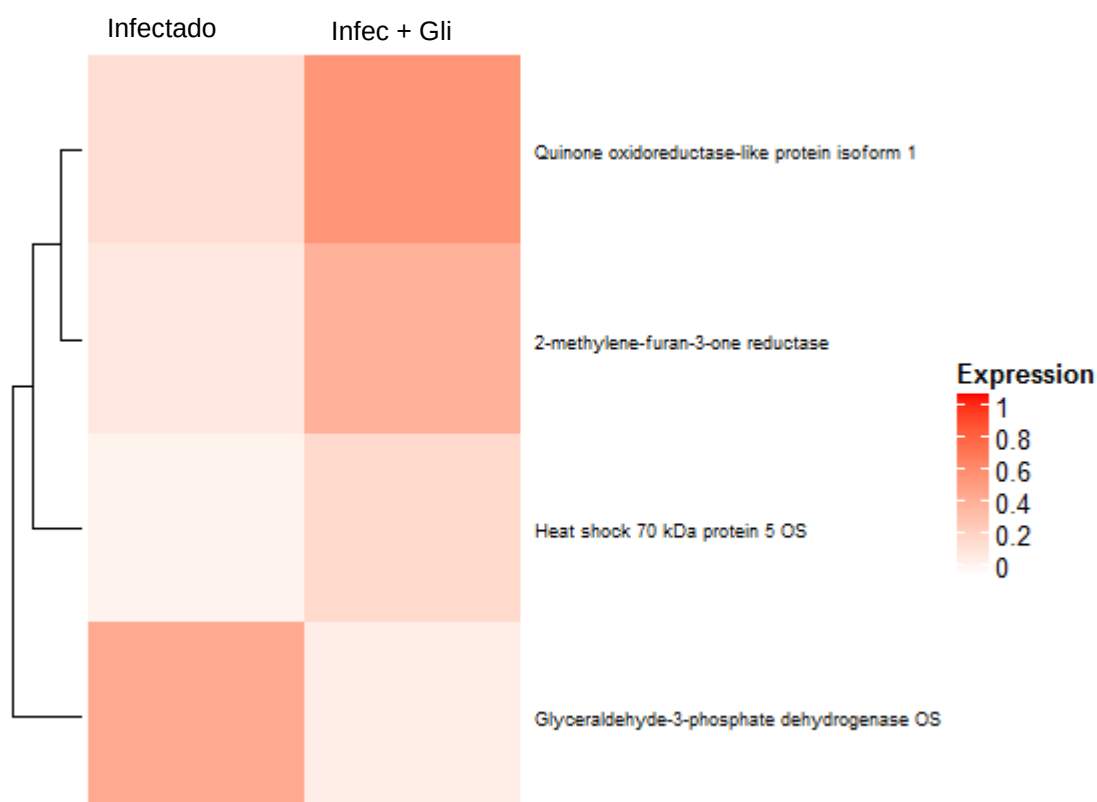


Figura 25 - Gráfico *heat map* das proteínas diferencialmente acumuladas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* CCN 51, infectado com *M. pernicioso*, na ausência (Infec) e na presença de glicose (Infec + Gli), relacionadas ao processo de oxirredução.

Proteínas envolvidas nos processos de defesa foram detectadas nas folhas dos genótipos ‘Catongo’ e CCN 51. Todas as proteínas detectadas em ambos os genótipos com essa função, apresentaram maior expressão nos tratamentos infectados com o patógeno na presença do elicitor glicose, em comparação com o controle (infectado com o patógeno) (Figura 26 e 27). Além disso, foram encontradas proteínas importantes envolvidas na defesa, como as Chaperoninas e proteínas receptoras de atividade quinase (Figura 26).

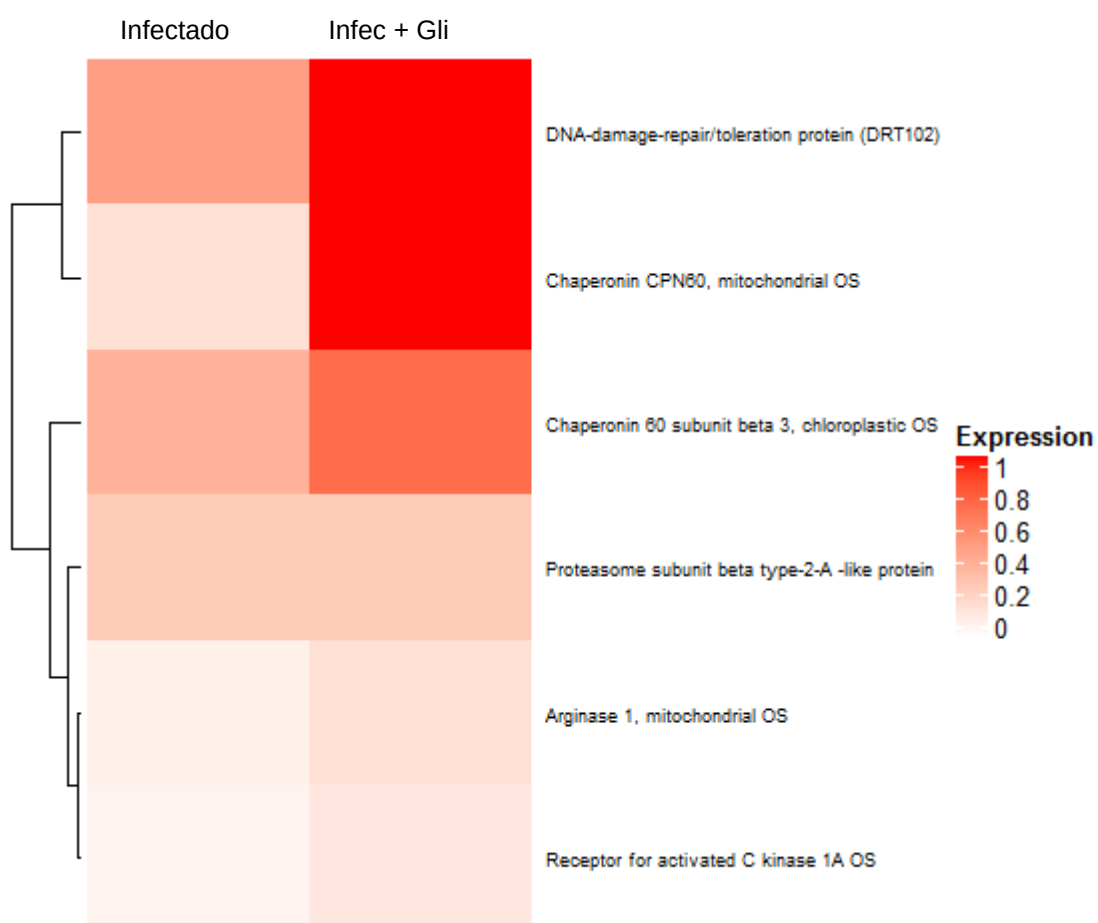


Figura 26 - Gráfico *heat map* das proteínas diferencialmente acumuladas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* 'Catongo', infectado com *M. pernicioso*, na ausência (Infestado) e na presença de glicose (Infec + Gli), relacionadas ao processo de resposta de defesa e estresse.

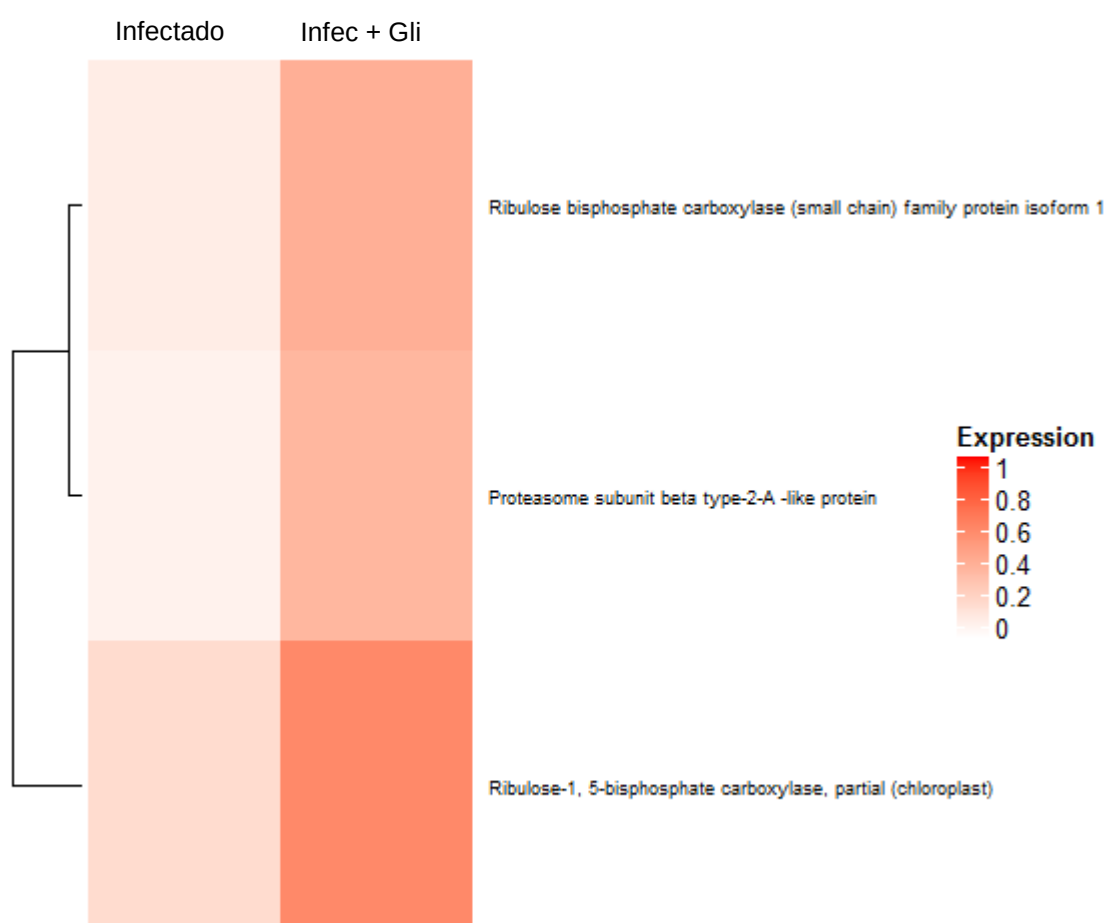


Figura 27 - Gráfico *heat map* das proteínas diferencialmente acumuladas identificadas em folhas de plantas jovens do genótipo de *T. cacao* CCN 51, infectado com *M. pernicioso*, na ausência (Infectado) e na presença de glicose (Infec + Gli), relacionadas ao processo de resposta de defesa e estresse.

5. DISCUSSÃO

As plantas estão expostas constantemente a diversos tipos de estresses, sejam eles, bióticos ou abióticos. Esses estresses causam efeitos de toxicidade nas plantas, por meio do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais afetam negativamente o crescimento, desenvolvimento e, ou sua produtividade (MITTLER, 2002; SOARES; MACHADO, 2007). A produção de ROS é proveniente de múltiplas reações nas membranas celulares, retículo endoplasmático, mitocôndrios e peroxissomos (HSIEH et al., 2014; MITTAL et al., 2014). Quando em excesso, ROS danificam os organelos celulares vitais nas plantas, além da destruição da membrana, indução a degradação de pigmentos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, resultando em morte celular programada (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011). São moléculas quimicamente reduzidas, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\bullet}$). As plantas possuem um sistema antioxidante que funciona como mecanismo de defesa contra ROS, a fim de minimizar ou impedir o estresse oxidativo, dos quais participam algumas enzimas, como SOD, CAT, APX e GPX (SOARES, 2008).

A enzima SOD, presente no citosol e no mitocôndrio, é responsável pela conversão do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (HOSSAIN et al., 2009). Ao analisar a atividade de SOD neste estudo (Figura 1), constatou-se que houve um aumento na atividade desta enzima, em nível foliar, no genótipo de *T. cacao* intolerante ao *M. perniciosa* ('Catongo'), quando tratado com elicitores químicos e infectado com *M. perniciosa*, em comparação ao controle (infectado com *M. perniciosa* na ausência dos elicitores), sendo que o tratamento com ácido salicílico foi o que teve maior acúmulo de SOD. Ainda, houve também maior acúmulo de SOD nas folhas do genótipo tolerante ao fungo *M. perniciosa* (CCN 51), quando elicitado por ácido salicílico e infectado com *M. perniciosa*, o qual já é considerado uma molécula sinalizadora de defesa na imunidade de plantas contra patógenos biotróficos e hemibiotróficos (PIETERSE et al., 2009). Isso significa que os tratamentos com os elicitores químicos sacarose, glicose e ácido salicílico favoreceram o aumento de SOD nas folhas de plantas jovens de *T. cacao* do genótipo intolerante ao *M. perniciosa*, agindo contra o estresse oxidativo causado pelo patógeno. Este fato pode ser justificado pela presença de SOD, quando identificada por espectrometria de massas no mesmo genótipo (*spot* 36) (Tabela 2). Em experimentos Yue et al.

(2018), realizando estudos com sementes e plântulas de *Robinia pseudoacacia* tratadas com o hormônio vegetal 24-epibrassinolídeo e cultivadas em solo salino, observaram que a atividade de SOD também foi aumentada, mostrando que houve estresse oxidativo durante o estresse abiótico.

Outras enzimas agem durante o estresse oxidativo, dentre as quais se destaca a catalase (CAT), uma enzima peroxisomal, que transforma H_2O_2 , molécula altamente tóxica para célula, em H_2O e O_2 , considerada a enzima mais eficiente deste processo (GILL; TUTEJA, 2010). Neste trabalho, ao verificar a atividade desta enzima (Figura 2), observou-se que houve maior atividade nos tratamentos com elicitores químicos e infectados com o patógeno para ambos os genótipos avaliados, quando comparados aos seus respectivos controles (infectados com o patógeno na ausência dos elicitores). Estes resultados foram comprovados com a detecção dos altos níveis de expressão dessa enzima pela técnica do *Western Blot*, evidenciando que os elicitores químicos promoveram o aumento da expressão dessa enzima contra o estresse oxidativo induzido pelo patógeno em ambos os genótipos de *T. cacao* (Figura 5).

Além disso, ao verificar a atividade de APX em folhas do genótipo ‘Catongo’, (Figura 3) não foi observado um aumento significativo entre controle (infectado com o patógeno na ausência dos elicitores) e os tratamentos elicitados e infectados com o patógeno. Por outro lado, no genótipo CCN 51, notou-se que houve um aumento na atividade de APX em nível foliar, nos tratamentos elicitados e infectados com o patógeno, quando comparados com o controle (infectado com o patógeno na ausência dos elicitores), sendo o tratamento com ácido salicílico o que apresentou maior atividade. Em estudos realizados por Reis et al. (2018) utilizando folhas jovens do mesmo genótipo de *T. cacao* CCN 51, quando as plantas foram submetidas ao estresse mecânico, obteve os mesmos resultados, ou seja, foi observado que também houve um aumento significativo na atividade da enzima APX nas folhas das plantas desse genótipo submetidas ao estresse. Durante suas análises sobre indução de resistência em *T. cacao*, Ribeiro et al. (2016) também notou na combinação CCN-51/SIC-876, que tanto o enxerto e porta-enxertos contribuíram para os maiores valores de atividade de APX no tratamento infectado com *M. perniciosus*. Em relação a GPX, o genótipo intolerante a *M. perniciosus* (‘Catongo’) apresentou maior atividade de GPX em comparação ao tolerante (CCN 51) (figura 3), porém ambos os genótipos apresentaram diminuição da atividade dessa enzima

quando comparado os tratamentos (infectados com *M. perniciosa* na presença dos elicitores) com os controles (infectado com o patógeno na ausência dos elicitores). Por outro lado, sob o estresse mecânico, Reis et al. (2018) observou incrementos da GPX em folhas jovens do genótipo CCN 51. Nessa perspectiva, pode significar que GPX foi mais eficiente na destoxificação celular, no genótipo 'Catongo' intolerante ao *M. perniciosa*, durante a remoção de H₂O₂, em condições de estresse biótico. Essas respostas salientam que as plantas apresentam diferentes mecanismos de defesa, independente das condições de estresses em que são submetidas.

Sobre o perfil proteômico dos genótipos de *T. cacao* ('Catongo' e CCN 51) infectados com *M. perniciosa* na presença e ausência de glicose. O genótipo 'Catongo' apresentou maior acúmulo de *spots* no tratamento infectado com *M. perniciosa* na presença de glicose, quando comparado com seu controle (infectado com o patógeno na ausência de glicose) (Figura 11). Estes resultados podem estar relacionados com presença de grande quantidade de proteínas envolvidas no metabolismo energético (OH et al., 2010; EL-AKHAL et al., 2013; GONZÁLEZ-RODRIGUEZ et al., 2015).

A maior parte das proteínas diferencialmente acumuladas, identificadas nos dois genótipos de *T. cacao* ('Catongo' e CCN 51) infectados com *M. perniciosa* na presença e ausência de glicose deste estudo fazem parte dos processos metabólicos celulares e fotossintéticos (Figuras 16 e 18). Camillo et al. (2013) obteve os mesmos resultados quando analisou o perfil proteômico de dois isolados de *M. perniciosa* em genótipos contrastantes para a resistência a vassoura de bruxa em resposta ao fluido apoplástico de cacau. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos realizados por Wang et al. (2017) com plantas de *Limonium bicolor* submetidas ao estresse salino, o qual observou que a maioria das proteínas diferencialmente acumuladas detectadas fazem parte do metabolismo das plantas. Isso pode ser explicado, visto que a via glicolítica é uma via central no metabolismo energético celular, as proteínas dessa via são as mais expressas em diferentes organismos (COBOS et al., 2010).

O fornecimento de energia é necessário para as plantas sobreviverem ao estresse biótico, pois há a necessidade de regulação de diferentes processos celulares, como a eliminação do excesso de ROS durante o estresse oxidativo. Isso acontece quando há regulação de ATP dentro das células, principalmente via glicólise, como já foi citado é a principal via metabólica para fornecimento de energia

(PLAXTON, 1996). Proteínas importantes nesse processo, como a aldolase da frutose-bisfosfato (*spot* 8 e 116) e desidrogenase do malato (*spot* 56), foram expressas nas folhas do genótipo 'Catongo' (Tabela 2), sendo o *spot* 8 e 116 os que apresentaram maior acúmulo no tratamento infectado com *M. pernicioso* na presença de glicose em relação ao controle infectado com *M. pernicioso* na ausência de glicose. No genótipo CCN 51 (Tabela 3) também foram detectadas as enzimas aldolase de frutose-bisfosfato (*spots* 123, 140 e 243) e desidrogenase do malato (*spot* 9, 85 e 136) ambas apresentaram maior expressão no tratamento infectado com o patógeno na presença de glicose em comparação com o controle (infectado com o patógeno na ausência do elicitor). Nas plantas o aumento da expressão de proteínas metabólicas pode estar associada a forma mais eficiente de resposta a infecção, ou seja, respostas mais rápidas na indução e ativação de mecanismos de defesa (BERGER et al., 2007).

A fotossíntese é um dos processos afetados pelos estresses em plantas. Enzima importante como a ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) foram detectadas neste estudo. A Rubisco é a principal enzima do ciclo de Calvin (JI, FU-SANG et al 2018), desempenhando função catalítica. Nas folhas do genótipo 'Catongo' não houve diferenças significativas para a regulação da expressão dessa enzima Rubisco no tratamento infectado com o patógeno na presença de glicose e no controle (infectado com o patógeno na ausência de glicose). Isto significa que a sua expressão é afetada pelo estresse causado pelo patógeno e que a glicose mitiga esse estresse biótico, não havendo mudanças em sua atividade. No genótipo tolerante a *M. pernicioso* (CCN 51) (Tabela 3) houve maior acúmulo da Rubisco no tratamento (infectado com *M. pernicioso* na presença do elicitor glicose) em comparação com o controle (infectado com *M. pernicioso* na ausência de glicose) (*spots* 31, 32, 129, 137, 214 e 232). O aumento da expressão dessa enzima indica que um nível mais alto de fotossíntese está ocorrendo quando as plantas estão submetidas ao estresse. Fornecendo dessa forma matéria-prima extra, material necessário para a produção de carboidratos e energia para o crescimento das plantas (WANG et al., 2017).

Ainda no presente estudo foram identificadas proteínas associadas ao metabolismo energético como a ATP sintase (*spot* 143 no genótipo 'catongo', *spots* 2, 8, 80 e 178 no genótipo CCN 51), enzima fundamental para a produção de ATP a partir de ADP + Pi (BARACCA et al., 2000), responsável por vários mecanismos de

regulação. Foi identificada expressão diferencial dessa enzima nos tratamentos infectados com *M. perniciosa* na presença de glicose nos genótipos de *T. cacao* contrastantes, quando comparados com os seus respectivos controles (infectados com *M. perniciosa* na ausência de glicose). Isto significa que em condições deste estresse biótico houve diminuição da produção de ATP nos cloroplastos. Estes resultados da análise por espectrometria de massas foram comprovados por meio da técnica *Western Blot* (Figura 6).

Foram detectadas e analisadas proteínas foliares envolvidas no processo de oxirredução em ambos os genótipos de *T. cacao* infectados com *M. perniciosa* na presença (tratamento) e ausência (controle) do elicitor glicose. No genótipo 'Catongo' (Tabela 2) todas as proteínas detectadas envolvidas nesse processo apresentaram menor acúmulo no tratamento em relação ao controle, dentre elas a proteína aldeído desidrogenase (*spot* 151). Essa proteína desempenha um papel importante na desintoxicação de aldeídos gerados pelo estresse oxidativo em plantas (REIS et al., 2017). Em estudos realizados por Reis et al. (2015) com metais tóxicos em *T. cacao*, foi detectada essa proteína com maior acúmulo nas raízes de plantas tratadas com o metal, como uma resposta ao estresse abiótico. Isso significa que o elicitor químico no presente estudo pode estar mitigando a expressão dessa proteína na presença do elicitor. O estresse oxidativo é uma das respostas de defesa ao estresse mais rápida que ocorre nas plantas. A SOD foi detectada por meio da técnica espectrometria de massas, no genótipo intolerante ao *M. perniciosa* 'Catongo' (*spot* 36), é a primeira enzima a agir durante o estresse oxidativo, impedindo o aumento de moléculas tóxicas como o ânion superóxido (O_2^-), pois realiza a catalise de O_2^- produzindo o O_2 e o H_2O_2 (WANG et al., 2013). Por outro lado estudos realizados por Lima et al. (2016), conseguiu identificar a dismutase do superóxido (SOD) ao analisar elicitores químicos na indução de resistência via foliar no genótipo CCN 51 tolerante a *M. perniciosa*.

No genótipo 'Catongo' (Tabela 2), intolerante a *M. perniciosa*, foi detectada a proteína peroxirredoxina (*spot* 110) com menor acúmulo no tratamento (infectado com *M. perniciosa* na presença de glicose) em comparação ao controle (infectado com *M. perniciosa* na ausência de glicose), uma família de enzimas peroxidases, as quais possuem a função de degradar peróxidos, sendo sensíveis à oxidação (POYNTON; HAMPTON, 2014). Essas proteínas podem atuar durante o estresse oxidativo como chaperonas ou reguladoras do ciclo celular (KÖNIG et al., 2013). As

peroxiredoxinas são essenciais para a virulência de alguns agentes patogênicos fúngicos (PANDEY et al., 2019). Em estudos realizados por Pandey et al. 2019, com proteínas miceliais e do secretoma do patógeno *T. indica*, cultivado na ausência e presença do hospedeiro (trigo), foi identificada a proteína peroxiredoxina com maior acúmulo envolvida na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio geradas pelo hospedeiro. Pode-se afirmar que no presente estudo o genótipo 'Catongo' infectado com o patógeno, na ausência do elicitor, favoreceu o acúmulo de ROS não só pela resposta da planta como também pela produção de H_2O_2 pelo fungo, aumentando o estresse oxidativo causado pelo estresse biótico ao comparar com o tratamento infectado e elicitado com glicose, o que demonstra eficácia do elicitor, o qual pode estar mitigando a interação planta-patógeno.

A redutase da ferredoxina-NADPH (*spot* 52) foi detectada com menor acúmulo no genótipo intolerante ao *M. pernicioso* ('Catongo') (Tabela 2) no tratamento infectado com *M. pernicioso* na presença de glicose, quando comparado com o controle infectado com *M. pernicioso* na ausência de glicose. Esta enzima atua em nível de PS1, na fase fotoquímica da fotossíntese, catalisando a transferência de elétrons da ferredoxina reduzida para o $NADP^+$, fornecendo, dessa forma, NADPH indispensável para as etapas de assimilação de dióxido de carbono na fase bioquímica da fotossíntese (SHIN; ARNON, 1965).

Nas folhas do genótipo CCN 51 (Tabela 3) tolerante ao *M. pernicioso*, infectado com o patógeno e na presença e ausência do elicitor glicose, foi detectada a proteína desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato (*spot* 79), que apresentou menor expressão no tratamento quando comparado ao controle. Além de estar relacionada a outras funções celulares, essa proteína faz parte da via glicolítica. Além disso, esta enzima catalisa a interconversão de 1,3 bisfosfoglicerato em gliceraldeído-3-fosfato, uma etapa dependente de NAD(P), tanto na glicólise quanto no ciclo de Calvin-Benson, cuja reação funciona como um centro de integração de sinal entre os processos de oxirredução (SPARLA et al., 2005). De acordo com Gesteira et al. (2007), esta enzima está envolvida na interação *T. cacao* e *M. pernicioso*. Além disso, possui sítios catalíticos de resíduos de cisteínas que podem ser oxidados por moléculas como H_2O_2 (HOLTGREFE et al., 2008). Neste momento, podem ocorrer as sinalizações de defesa da planta contra o estresse provocado pelo patógeno. Desta forma, pode-se afirmar que no tratamento infectado com *M. pernicioso*, na presença de glicose, as plantas não expressaram essa proteína como resposta de

defesa ao estresse, o elicitor químico pode estar promovendo resistência por meio de outros mecanismos de defesa.

No mesmo genótipo CCN 51 (Tabela 3), nos tratamentos infectados com *M. perniciosus* na ausência (controle) e presença de glicose (tratamento), foi detectada a enzima oxidoredutase da quinona (*spot* 245), com maior acúmulo no tratamento em relação ao controle. É uma proteína que atua como transportadora de elétrons no interior das membranas tilacóides dos cloroplastos e na membrana interna mitocondrial, nas cadeias de transporte de elétrons da fotossíntese e respiração (CRAMER et al., 1991). O aumento da expressão desta proteína está relacionado ativamente à conexão quimiosmótica, protegendo as células de danos causados pela formação de ROS (BAN et al., 1992).

A proteína receptora de atividade quinase, importante proteína com funções específicas, como resposta de defesa e estresse, envolvida no processo de transcrição/tradução e biossíntese de proteínas, foi detectada no genótipo 'Catongo' intolerante ao fungo *M. perniciosus* (Tabela 2). Foi identificada, apresentando maior expressão no tratamento infectado com *M. perniciosus* na presença de glicose ao comparar com o controle Infectado com *M. perniciosus* na ausência de glicose. As receptoras de atividade quinase são proteínas que participam da ativação de cascata de sinalização intracelular, regulando as inúmeras modificações bioquímicas e fisiológicas no processo celular das plantas (DIÉDHIOU et al., 2008; TAYLOR et al., 2013). Essas proteínas possuem, como uma das suas principais funções, a capacidade de degradação da parede celular de fungos em resposta a infecções (WAN; PENTECOST, 2013). A matriz da parede celular fúngica é composta de quitina, uma molécula essencial para o crescimento, desenvolvimento e, conseqüentemente, a patogenicidade. Dessa forma, supõe que esta proteína está diretamente ligada ao processo de defesa contra *M. perniciosus*.

Em folhas de ambos os genótipos de *T. cacao*, 'Catongo' (*spots* 89 e 136) (Tabela 2) e CCN 51, foram identificadas as proteínas BiP, as quais são consideradas proteínas chaperonas que interagem transitoriamente com uma ampla variedade de proteínas, ou seja durante o estresse interagem com proteínas desnaturadas no retículo endoplasmático (CASTEL et al., 1999). As BiPs pertencem a família das HSP70, proteínas de choque térmico (MATTOS-MOREIRA et al., 2018). Estas proteínas foram descobertas pela primeira vez em *Drosophila* (RITOSSA, 1964). Em condições de estresse as chaperonas em maior expressão

são essenciais para a sobrevivência da célula, visto que são responsáveis pelo enovelamento proteico e pela homeostase celular (REIS et al., 2011). Além disso, elas protegem as células contra danos oxidativos, se ligando a resíduos hidrofóbicos expostos ao estresse de proteínas desnaturadas, impedindo-as de se agregarem e promovendo o redobramento (GHOSH et al., 2018).

A proteína *heat shock* (HSP 70) também foi identificada em folhas do genótipo CCN 51 (*spot* 116) (Tabela 3), apresentando maior acúmulo nas plantas jovens de *T. cacao* inoculadas com *M. perniciosa*, na presença do elicitor glicose, em comparação com controle (infectado com *M. perniciosa* na ausência do elicitor). Como já citado estas proteínas desempenham a função de dobramento proteico e de manutenção da integridade conformacional de proteínas (WANG et al., 2004). Além disso, participam da degradação de proteínas danificadas (COUX et al., 1996). As Bips (chaperonas) foram detectadas com maior acúmulo (*Up regulation*) pela técnica do *Western Blot* (Figura 7), nos tratamentos de ambos os genótipos de *T. cacao* avaliados, apresentando expressão diferencial quando infectado com o patógeno na presença dos elicitores (sacarose, glicose e ácido salicílico), em comparação ao tratamento controle (infectado com o patógeno na ausência dos elicitores). Isto significa que houve um aumento na resistência induzida ao patógeno promovido pelos elicitores químicos. Wang et al. (2017) quando analisou proteínas diferencialmente acumuladas de *Limonium bicolor* sob o estresse salino, também observou maior acúmulo dessa proteína nas plantas submetidas ao estresse. Portanto, essas proteínas podem apresentar níveis de expressão diferentes em genótipos tolerantes e intolerantes, ou seja, isoformas de uma mesma proteína pode reagir diferentemente contra o patógeno. Zamany et al. (2012), observou essa característica das HSPs, durante uma análise de susceptibilidade e resistência entre *Pinus monticola* e o fungo *Cronartium ribicola*.

6. CONCLUSÕES

- No genótipo CCN 51, infectado com o patógeno, os elicitores químicos sacarose, glicose e ácido salicílico promoveram um aumento na atividade das enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo (SOD, CAT, APX e GPX), em nível foliar.
- Os elicitores químicos sacarose, glicose e ácido salicílico aumentaram significativamente a expressão da enzima catalase e da proteína β *AtpB sintase* nos genótipos 'Catongo' e CCN 51 infectados com *M. perniciosa*.
- O genótipo tolerante ao *M. perniciosa* (CCN 51) apresentou maior expressão de proteínas, tanto no controle (infectado com o patógeno na ausência de glicose) quanto no tratamento infectado com o patógeno e elicitado com glicose, quando comparado com o genótipo intolerante ao *M. perniciosa* ('Catongo').
- O perfil proteico foliar do genótipo 'Catongo', tratado com o elicitor químico glicose, apresentou um maior perfil de proteínas detectadas durante a interação planta-patógeno, relacionadas ao processo de oxirredução e defesa ao estresse, demonstrando que as plantas deste tratamento apresentaram mais mecanismos de tolerância ao estresse se comparado com o controle (infectado com *M. perniciosa* na ausência de glicose).

7. REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. Plant Pathology. **Elsevier**, 5, 922, 2004.

ALAGARASAN, Ganesh; ASWATHY, Kumar S.; MADHAIYAN, Munusamy. Shoot the Message, Not the Messenger—Combating Pathogenic Virulence in Plants by Inhibiting Quorum Sensing Mediated Signaling Molecules. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 556, 2017.

ALBUQUERQUE, J.A.; REINERT, D.J.; FIORIN, J.E.; RUEDELL, J.; PETRERE, C. & FONTINELLI, F. Rotação de culturas e sistemas de manejo do solo: efeito sobre a forma da estrutura do solo ao final de sete anos. R. Bras. **Ci. Solo**, 19:115-119, 1995.

ALMASALMEH, ABDULNASSER et al. Structural determinants of the hydrogen peroxide permeability of aquaporins. **The FEBS journal**, v. 281, n. 3, p. 647-656, 2014.

ALMEIDA, A-A.F., and VALLE, R.R. Ecophysiology of the cacao tree. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 19, 426–448, 2007.

ALMEIDA, A-A. F.; VALLE, R. R. Cacao: ecophysiology of growth and production: In: **ECOPHYSIOLOGY OF TROPICAL TREE CROPS**, Nova Science Publishers, Inc., **Hauppauge**, p. 37-70, 2009.

ALSCHER, RUTH GRENE; ERTURK, NEVAL; HEATH, LENWOOD S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.

ANDERBRHAN, T., ALMEIDA, L.C., NAKAYAMA, H.I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicios* (Stahel) Singer: A experiência da Amazônia Brasileira. **Agrotrópica**, 10: 49-60, 1998.

APEL, K. e HIRT, H. Espécies Reativas de Oxigênio: Metabolismo, Estresse Oxidativo e Transdução de Sinal. **Annual Review of Plant Biology**, 55, 373-379, 2004.

ASADA, K. E TAKAHASHI, M. Produção e Eliminação de Oxigênio Ativo em Cloroplastos. Em: Kyle, DJ, Osmond, CB e Arntzen, CJ, Eds., **Fotoinibição**, **Elsevier**, Amsterdã, 227-287, 1987.

ATHAYDE SOBRINHO, C.; FERREIRA, P.T.O.; CAVALCANTI, L.S.C. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.) **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba, SP, **FEALQ**, p. 51-80, 2005.

BACH, E. E.; BARROS, B. C.; KIMATI, H. Induced resistance against *Bipolaris bicolor*, *Bipolaris sorokiniana* e *Drechslera tritici-repentis* in wheat leaves by xanthan gum and heat-inactivated conidial suspension. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, p. 411-418. 2003.

BALDWIN, IAN T. Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 14, p. 8113-8118, 1998.

BAN, R. et al. Destruction of vitamin K1 of cultured cells by ultraviolet radiation and its effect on plasma membrane electron transport reactions. **International Journal of Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 449-456, 1992

BARACCA, A. et al. Catalytic Activities of Mitochondrial ATP Synthase in Patients with Mitochondrial DNA T8993G Mutation in the ATPase 6 Gene Encoding Subunit a. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 6, p. 4177- 4182, 2000.

BARROS, F. C.; SAGATA, E., FERREIRA, L.C.C., JULIATTI, F.C., Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 231-239, Mar./Apr. 2010.

BÉCOT, S.; PAJOT, E.; LE CORRE, D.; MONOT, C.; SILUÉ, D. FITOGARD® (K₂HPO₃) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, p. 417-425. 2000.

BEKTAS, YASEMIN; EULGEM, THOMAS. Synthetic plant defense elicitors. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 804, 2015.

BERGER, S.; SINHA, A.K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, 58 (15/16): 4019–4026, 2007

BIGEARD J, COLCOMBET J, HIRT H. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). **Mol Plant** 8: 521–539, 2015.

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.

BOSTOCK, R.M. Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**, v.43, p.545-580, 2005.

BUZI A, CHILOSI G, DE SILLO D, MAGRO P., Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. **Journal of Phytopathology** 152:34-42, 2004.

CABELO, F.; JORRÍN, J. V.; TENA, M. Chitinase and β -1,3-glucanase activities in chickpea (*Cicer arietinum*). Induction of different isoenzymes in response to wounding and ethephon. **Physiologia Plantarum**. v. 92, p. 654-660. 1994.

CAMILO, F.R. Indutores de resistência contra a vassoura-de-bruxa no cacau: mecanismos de ação e avaliação em campo. Dissertação (mestrado). 53 p. Lavras: UFLA, 2009.

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 (Doutorado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2013.

CASTEL, Nathalie L.; DOOREN, E. P. W. M. J. V.; CROFTS, Andrew J.; DENECKE, J. Overexpression of BiP in Tobacco Alleviates Endoplasmic Reticulum Stress. **The Plant Cell**, V 11, p. 459–469. 1999.

CASTRO LO; BACH EE. Germinação de sementes de *Dendrobium* sp. (Orchidaceae) e cultura de tecido visando produção de mudas. REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 19. Resumos...São Paulo: RAIB. p.114, 2007.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, I.S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ. p. 81-124, 2005.

CAVALCANTE, F.M.L., ALMEIDA, I.V., MELO, K.A., PANIZZON, P.N.B., RHODEN, S.A., PAMPHILE, J.A., Interação patógeno planta: respostas frente ao ataque. **Rev. Saúde e Biol.**, v.8, n.3, p.90-97, 2013.

CAVATTE, P. C. et al. Could shading reduce the negative impacts of drought on coffee? a morphophysiological analysis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 144, p. 111-122, 2012.

CHEOL SONG, G.; SIM, H. J.; KIM, S. G.; RYU, C. M. Root-mediated signal transmission of systemic acquired resistance against above-ground and belowground pathogens. **Ann Bot**, 2016.

CHÉRIF, A., A. ASSELIN & R.R. BÉLANGER. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. **Phytopathology** 84: 236-242, 1994.

CIPOLLINI, D. F. Does competition magnify the fitness costs of induced responses in *Arabidopsis thaliana*? A manipulative approach. **Oecologia**, Berlin, v. 131, p. 514-520. 2002.

COBOS, R. et al. Cytoplasmic- and extracellular-proteome analysis of *Diplodia seriata*: a phytopathogenic fungus involved in grapevine decline. *Proteome science*, v. 8, p. 46, 2010.

COLEY, P. D. Effects of plant growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore defense. **Oecologia**, v. 74, n. 4, p. 531-536, 1988.

COSTA, J. C. B.; RESENDE, M. L. V.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; CAMILO, F.R.; MOTEIRO, A.C.A.; PEREIRA, R.B. Indução de resistência em mudas de cacaueiro contra *Moniliophthora perniciosa* por produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado. **Tropical Plant Pathology**, vol. 35, 5, 285-294. 2010.

COUX, O. et al. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65: 801-847. 1996.

CRAMER, W. A. et al. Electron transport between photosystem II and photosystem I. **Current Topics in Bioenergetics**, v. 16, n. 1, p. 179-222, 1991

CURSINO-SANTOS, JR; DEFINA, TPA; MARTINEZ-ROSSI, NM. Os segredos das plantas e de seus patógenos na era molecular. Ribeirão Preto: **SBG**, 45p, 2003.

COQUOZ JL, BUCHALA AJ, MEUWLY PH, MÉTRAUX JP. Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. **Phytopathol**;85:1219–1224, 1995.

DIÉDHIOU, C. J. et al. The SNF1-type serine/threonine protein kinase SAPK4 regulates stress-responsive gene expression in rice. *BMC Plant Biology*, v. 8. n. 1, p. 49, 2008

DEL RÍO, LUIS ALFONSO; PUPPO, Alain. Reactive oxygen species in plant signaling. Berlin: **Springer**, 2009.

DE FREITAS, M. B., AND STADNIK, M. J. Physiological and molecular plant pathology race-specific and ulvan-induced defense responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) against *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 78, 8–13. 2012.

DIAS, E.; BATTILANI, J. L; SOUZA, A. L. T. DE; PEREIRA, S. R.; KALIFE, C.; SOUZA, P. R. de; JELLER, H. Manual de Produção de Sementes de Essências Florestais Nativas. Série: Rede de Sementes do Pantanal, nº 2. Campo Grande: Editora UFMS, 2006b.

DJAMI-TCHATCHOU, A. T., NCUBE, E. N., STEENKAMP, P. A., & DUBERY, I. A.. Similar, but different: structurally related azelaic acid and hexanoic acid trigger

differential metabolomic and transcriptomic responses in tobacco cells. **BMC plant biology**, v. 17, n. 1, p. 227, 2017.

DURRANT, W.E. & DONG, XINNIAN. Systemic Acquired Resistance. **Annual review of phytopathology**. 42. 185-209, 2004.

EBEL, J.; COSIO, E.G. "Elicitors of plant defense responses". *International Review of Cytology*, 148: 1–36, 1994.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; LEVY, M.; GOLDSBROUGH, P. Reexamining the Classification of *Theobroma cacao* L. Using Molecular Markers. **Journal of day American Society for Horticultural Science**, 119 (5):1073–1082, 1994.

FINKEL, T. Redox-dependent signal transduction. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. p.476, 52-54, 2000.

F BOL, J.; LINTHORST, HUUB.; CORNELISSEN, BEM. Plant Pathogenesis-Related Proteins Induced by Virus Infection. **Annual Review of Phytopathology**. 28, 113/138, 2003.

GESTEIRA, A.S.; MICHELI, F.; CARELS, N.; SILVA, A.C.; GRAMACHO, K.P.; SCHUSTER, I.; MACEDO, J.N.; PEREIRA, G.A.; CASCARDO, J.C. Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora perniciosa*. **Annual of Botany**, 100: 129-140, 2007.

GESTEIRA, A. S., et al. Comparative Analysis of Expressed Genes from Cacao Meristems Infected by *Moniliophthora perniciosa*. **Annals of Botany**, v. 100, p. 129-140, 2007.

GHOSH, SUMIT et al. Role of Heat Shock Proteins in Oxidative Stress and Stress Tolerance. In: **Heat Shock Proteins and Stress**. Springer, Cham, p. 109-126. 2018.

GIANNOPOLITIS C. N. and S. K RIES, "Superoxide Dismutase I. Occurrence in Higher Plants." **Plant Physiology**, 59 (2), 309-314, 1977.

GILL S. S., TUTEJA N). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiol. Biochem.** 48 909–930, 2010.

GLAZEBROOK, JANE. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. **Annual review of Phytopathology**. VL- 43, 27, 205, 2005.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; PRATS, E.; JORRÍN-NOVO, J. V. Proteomics of plant pathogenic fungi. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, 9: 325-327, 2010.

GRAMACHO, I.C.P.; MAGNO, A.E.S.; MANDARINO, E.P. & MATOS, A. Cultivo e beneficiamento do cacau na Bahia. Ilhéus, CEPLAC, 124p, 1992.

GRANT, M. & LAMB, C. Systemic immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 9(4): 414-420, 2006.

GUZZO, S.D. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. Centro de energia nuclear na agricultura, Universidade de São Paulo. 2004.

HAMMOND-KOSACK, K.E., SILVERMAN, P., RASKIN, I., and JONES, J.D.G. Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* induce changes in cell morphology, and ethylene and salicylic acid synthesis, in tomato cells carrying the corresponding Cf-disease resistance gene. **Plant Physiol.** 110, 1381-1394, 1996.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 4. **Oxford**: Clarendon; 2007.

HASANUZZAMAN M, HOSSAIN MA, FUJITA M. Exogenous selenium pretreatment protects rapeseed seedlings from cadmium-induced oxidative stress by upregulating antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems. **Biol Trace Elem Res.** 2012b

HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, 84: 450-455, 1987.

HEATH, M.C. Morte relacionada à resposta hipersensitiva. **Plant Mol. Biol.** 44, 321 a 333. 2000.

HEIL, M.; HILPERT, A.; KAISER, W.; LINSSENMAIR, K.E. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defense: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? **Journal of Ecology**, v.88, p.645-654, 2000.

HEIL, MARTIN; BALDWIN, IAN T. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. **Trends in plant science**, v. 7, n. 2, p. 61-67, 2002.

HEIJARI, JUHA et al. Application of methyl jasmonate reduces growth but increases chemical defence and resistance against *Hylobius abietis* in Scots pine seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 115, n. 1, p. 117-124, 2005.

HOGENHOUT, S. A.; VAN DER HOORN, R. A. L.; TERAUCHI, R. & KAMOUN, S. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 22(2): 115-122, 2009.

HOLTGREFE, S.; GOHLKE, J.; STARMANN, J.; et al. Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate de-hydrogenase isoforms by thiol modifications. **Physiology.Plant.**, v. 33, p. 211–228, 2008.

HOSSAIN, M. A. et al. Stress-induced changes of methylglyoxal level and glyoxalase I activity in pumpkin seedlings and cDNA cloning of glyoxalase I gene. **Australian Journal of Crop Science**, v. 3, n. 2, p. 53-64, 2009.

HSIEH, HSYUE-JEN et al. Shear-induced endothelial mechanotransduction: the interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological implications. **Journal of biomedical science**, v. 21, n. 1, p. 3, 2014.

International Cocoa Organization. Acessado em: www.icco.org (ICCO, 2015/2016).

IURKIV, L.; ECKSTEIN, B.; BALBI-PEN, M. I.; STANGARLIN, J. R.; SCHWANESTRADA, K.R.F. Atividade de peroxidase em tomateiro tratado com *Curcuma longa* e infectado com *Alternaria solani*. **Summa Phytopathologica**. v.32, n.(supl.), p.22, 2006.

JEWORUTZKI, E., ROELFSEMA, M. R. G., ANSCHU, U., KROL, E., ELZENGA, J. T. M., FELIX, G., et al. Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca²⁺-associated opening of plasma membrane anion channels. **Plant J.** 62, 367–378. 2010.

JI, FU-SANG et al. Differential proteomic analysis reveals the mechanism of *Musa paradisiaca* responding to salt stress. **Molecular biology reports**, p. 1-12, 2018.

KANDAZ, MUSTAFA et al. The effects of zinc sulfate on the levels of some elements and oxidative stress occurring in lenses of rats exposed to total cranium radiotherapy. **The Eurasian journal of medicine**, v. 41, n. 2, p. 110, 2009.

KARUPPANAPANDIAN, Thirupathi et al. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 709, 2011.

KUBICEK, CHRISTIAN P.; STARR, TREVOR L.; GLASS, N. LOUISE. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. **Annual review of phytopathology**, v. 52, p. 427-451, 2014.

LABANCA, E.R.G. Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*). Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2002.

LEÓN, I. P.; MONTESANO, M. Activation of defense mechanisms against pathogens in mosses and flowering plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 3178-3200, 2013.

LEE, H.J., K.I CHO, Y.O. KIM and B.H. RYU. The Seed Germination Response of *Rumex acetosella* by Distribution Area. **Korean J. Ecol.** 18(3): 353-366, 1995.

LIMA, N. S., Perfil proteômico e metabolismo antioxidativo de genótipos de cacau submetidos à indução de resistência à *Moniliophthora perniciosa* por meio de elicitores químicos. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual de Santa Cruz, 2016.

LUNA, E., BRUCE, T.J.A., ROBERTS, M. R., FLORS, V., and TON, J., Next-Generation Systemic Acquired Resistance. **Plant Physiol.** Vol. 158, 2012.

LUNDBORG, L., NORDLANDER, G., BJÖRKLUND, N., NORDENHEM, H., & BORG-KARLSON, A. K. Methyl jasmonate-induced monoterpenes in Scots pine and Norway spruce tissues affect pine weevil orientation. **Journal of chemical ecology**, v. 42, n. 12, p. 1237-1246, 2016.

MACMILLAN, J. Ocurrence of gibberelin in vascular plants, fungi, and bacteria. **Journal of Plant Growth Regulation**, 20: 387-442. 2002.

MADHUSUDHAN, R.; ISHIKAWA, T.; SAWA, Y.; SHIGEOKA S.; SHIBATA, H. Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells. **Physiologia Plantarum**, v.117, p.550-557, 2003.

MANIVANNAN, A., SOUNDARARAJAN, P., PARK, Y. G., & JEONG, B. R. Chemical elicitor-induced modulation of antioxidant metabolism and enhancement of secondary metabolite accumulation in cell suspension cultures of *Scrophularia kakudensis* Franch. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 399, 2016.

MATTOS-MOREIRA, LORENNA ALVES et al. Differentially expressed proteins associated with drought tolerance in bananas (*Musa* spp.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 3, p. 60, 2018.

MATROS, A.; PESHEV, D.; PEUKERT, M.; MOCK, H.; DEN ENDE, W.V. Sugars as hydroxyl radical scavengers: proof-of-concept by studying the fate of sucralose in *Arabidopsis*. **Plant J.**, 82, 822839, 2015.

MEJIA LC, ROJAS EI, MAYNARD Z., VAN BAELE SA, ARNOLD EA, HEBBAR P., et al. Fungos endofíticos como agentes de biocontrole de patógenos de *Theobroma cacao*. **Biol. Controle** 46, 4–14, 2008.

MENTEN, J. O.; MORAES, M. H. D. Tratamento de sementes: histórico, tipos, características e benefício. **Informativo ABRATES**, v. 20, n. 3, 2010.

MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, 107:13-18. 2001.

MITTAL, MANISH et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants & redox signaling**, v. 20, n. 7, p. 1126-1167, 2014.

MITTLER, RON. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MONTEIRO, W. R.; AHNERT, D. Melhoramento Genético do Cacaueiro. In: Ciencia, tecnologia e manejo do cacaueiro. 2ed. Brasília, p.11-30, 2012.

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

NEUHOFF, V. et al. 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**, v. 9: 255-262. 1988.

NIMSE, S.B.; PAL D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Adv.**, 5, 27986-28006, 2015.

NOCTOR, G. e FOYER, C.H. Ascorbato e Glutathione: Mantendo o Oxigênio Ativo sob Controle. Revisão Anual de Fisiologia Vegetal e Biologia Molecular de Plantas, 49, 249-279, 1998.

NOJOSA, G. B. de A.; RESENDE, M. L. V.; RESENDE, A. V. Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.; SOUZA; DI-PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V. de; ROMEIRO, R. da S. (Eds.). Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: **FEALQ**, 263 p, 2005.

NÜRNBERGER, T. Signal perception in plant pathogen defense. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 55, p.167-182, 1999

NÜRNBERGER, THORSTEN; BRUNNER, FRÉDÉRIC. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 4, p. 318-324, 2002.

OLIVEIRA, M.L.; LUZ E.D.M.N.; Principais doenças do cacaueiro e seu manejo. In: Valle RR (ed) Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacaueiro. **Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 187–275, 2012.

OLIVEIRA, W.F., SILVA, P.M.S., COELHO, L.C.B.B.C., CORREIA, M.T.S. Plant Antioxidants and Mechanisms of Action. **Letters in Drug Design & Discovery**, 15, 1103-1115, 2018.

OYEKALE, A.S., BOLAJI, M.B., and OLAWA, O.W. The effects of climate change on cocoa production and vulnerability assesment in Nigeria. **Agriculture Journal** 4, 77–85, 2009.

PANDEY, V., GUPTA, A. K., SINGH, M., PANDEY, D., & KUMAR, A. Complementary Proteomics, Genomics approaches identifies potential pathogenicity/virulence factors in *Tilletia indica* induced under the influence of host factor. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 553, 2019.

PEREIRA, J.L.M.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J.M.; ALMEIDA, L.C.C.; Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotrópica** 1:79–81, 1989.

PERL-TREVES, RAFAEL; PERL, A.; Oxidative stress: An introduction. **Oxidative Stress in Plants**. 1,3, 2002.

PLAXTON, William C. A organização e regulação da glicólise vegetal. **Revisão Anual de Biologia Vegetal**, v. 47, n. 1, p. 185-214, 1996.

PINTO, D.G., AGUILAR, M.A.G., SOUZA, C.A.S., SILVA, D.M., SIQUEIRA, P.R., CAO, J.R., ZANETTI, L. V., Alterações fisiológicas após aplicação de silício em cacau e sua influência na preferência por pulgões. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 59, n.3, p. 360-367, 2012.

PINTO, D. G.; AGUILAR, M. A. G.; SOUZA, C. A. S.; SILVA, D. M.; SIQUEIRA, P. R.; CAO, J. R.; ZANETTI, L. V., Fotossíntese, crescimento e incidência de insetos-praga em genótipos de cacau pulverizados com silício. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 30, n. 3, p. 715-724, 2014.

PIROVANI C.P., CARVALHO, H.A.S., MACHADO, R.C.M., GOMES, D.S., ALVIM, F.C., POMELLA, A.W.V., GRAMACHO K.P., CASCARDO J.C.M., PEREIRA G.A.G., MICHELI F. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. **Electrophoresis**, 29: 2391-2401, 2008.

PIETERSE CM, VAN WEES SC, VAN PELT JA, KNOESTER M., LAAN R., GERRITS H., et al. Uma nova via de sinalização controlando a resistência sistêmica induzida em *Arabidopsis*. **Célula Vegetal** 101571–1580, 1998.

PIETERSE, Corné MJ et al. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature chemical biology**, v. 5, n. 5, p. 308, 2009.

PONCE DE LEÓN, INÉS; MONTESANO, MARCOS. Activation of defense mechanisms against pathogens in mosses and flowering plants. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 2, p. 3178-3200, 2013.

POYNTON, R. A.; HAMPTON, M. B. Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, n. 2, p. 906-912, 2014.

PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. **Phytopathology**, St. Paul, v.34, p.573-594, 1996.

PUSZTAHELYI, TÜNDE; HOLB, IMRE J.; PÓCSI, ISTVÁN. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 573, 2015.

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.

REIS PAA, ROSADO GL, SILVA LAC, OLIVEIRA LC, OLIVEIRA LB, COSTA MDL, ALVIM FC, FONTES, EPB (2011) The Binding protein BiP attenuates stress-induced cell death in soybean via modulation of the N-rich protein-mediated signaling pathway. **Plant Physiol** 157:2011.

REIS, G. S. M., DE ALMEIDA, A. A. F., DE ALMEIDA, N. M., DE CASTRO, A. V., MANGABEIRA, P. A. O., & PIROVANI, C. P. . Molecular, Biochemical and Ultrastructural Changes Induced by Pb Toxicity in Seedlings of *Theobroma cacao* L. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0129696, 2015.

REIS, G. S. M., DE ALMEIDA, A. A. F., MANGABEIRA, P. A. O., DOS SANTOS, I. C., PIROVANI, C. P., & AHNERT, D. Mechanical stress caused by wind on leaves of *Theobroma cacao*: Photosynthetic, molecular, antioxidative and ultrastructural responses. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0198274, 2018.

RESENDE, M.L.V.; COSTA, J.C.B.; CAVALCANTI, F.R.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; CAMILO, F.R. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, 32 (3): 213-221, 2007.

RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; CAVALCANTI, L.S.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C.P.; PEREZ, J.O.; ANDRADE, G.C.G.; CARVALHO, G.A.; CASTRO, R.M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicios*a and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, 51: 621-628, 2002.

RESENDE, M.L.V., NOJOSA, G.B.A., AGUILAR, M.A.G., SILVA, L.H.C.P., NIELLA, G.R., CARVALHO, G.A., GIOVANINI, G.R., CASTRO, R.M. Perspectivas da indução de resistência em cacaueiro contra *Crinipellis pernicios*a através do benzoatiazole (BTH). **Fitopatologia Brasileira**, 25:149-156. 2000.

REUVENI, MOSHE; AGAPOV, VLADIMIR; REUVENI, REUVEN. A foliar spray of micronutrient solutions induces local and systemic protection against powdery

mildew (*Sphaerotheca fuliginia*) in cucumber plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, n. 7, p. 581-588, 1997.

RIBEIRO, MIGUEL A. Q., DE ALMEIDA, ALEX-ALAN F., ALVES, TAINÁ F. O., GRAMACHO, KARINA P., PIROVANI, CARLOS P., VALLE, RAÚL R. Rootstock × scion interactions on *Theobroma cacao* resistance to witches' broom: photosynthetic, nutritional and antioxidant metabolism responses. **Acta Physiologiae Plantarum**, 38: 73, 2016.

RITOSA, F. M. Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of *Drosophila*. **Experimental cell research**, v. 35, n. 3, p. 601-607, 1964.

ROCHA, H.M., WHEELER, B.E.J. Factors influencing the production of basidiocarps and deposition and germination of basidiospores of *Crinipellis pernicios*, the causal fungus of witches' broom on cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology**, 34: 319-328, 1985.

SAMOTA, M. K., SASI, M., AWANA, M., YADAV, O. P., AMITHA MITHRA, S. V., TYAGI, A., & SINGH, A. Elicitor-induced biochemical and molecular manifestations to improve drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) through seed-priming. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 934, 2017.

SANDALIO LM, RODRÍGUEZ-SERRANO M, ROMERO-PUERTAS MC, DEL RÍO L.A. ROLE of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules. **Subcell Biochem** 69: 231–255, 2013.

SATHIYABAMA M, BALASUBARAMANIAN R. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. **Crop Prot.** 17:307–313, 1998.

SAWADA, K., HASEGAWA, M., TOKUDA, L., KAMEYAMA, J., KODAMA, O., KOHCHI, T., YOSHIDA, K., SHINMYO, A. Enhanced resistance to blast fungus and bacterial blight in transgenic rice constitutively expressing OsSBP, a rice homologue of mammalian selenium-binding proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68:873-880, 2004.

SCHROTH, G., LÄDERACH, P., MARTINEZ-VALLE, A.I., BUNN, C., and JASSOGNE, L. Vulnerability to climate change of cocoa in West Africa: Patterns, opportunities and limits to adaptation. **Science of the Total Environment** 556, 231–241, 2016.

SCHWEIZER A , RUPP S , BN TAYLOR , RÖLLINGHOFF M , SCHRÖPPEL K. The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida Albicans*. **PubMed**, 435-45, p.38. 2009.

SELDAL, T., HEGLAND, S. J., RYDGREN, K., RODRIGUEZ-SAONA, C., & TÖPPER, J. P. How to induce defense responses in wild plant populations? Using

bilberry (*Vaccinium myrtillus*) as example. **Ecology and evolution**, v. 7, n. 6, p. 1762-1769, 2017.

SHARMA, PALLAVI; JHA, AMBUJ; SHANKER DUBEY, RAMA; PESSARAKLI, MOHAMMAD. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**. VL-2012. 2012.

SHAH, J., CHATURVEDI, R., CHOWDHURY, Z., VENABLES, B., and PETROS, R. A. Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. *Plant J.* 79, 645–658, 2014.

SHIN, M.; ARNON, D. I. Enzymatic mechanisms of pyridine nucleotide reduction in chloroplast. **Journal of Biology Chemistry**, v. 240, p. 1405-1411, 1965.

SILVA, D.M. M.H., BASTOS, C.N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicios*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatol. Bras.**, 32:143-145, 2007.

SOARES, C. Q. G. Proteômica diferencial e caracterização fisiológica de dois clones de *Coffea canefora* sob déficit hídrico. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2008.

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

SPARLA, F. et al. Regulation of photosynthetic GAPDH dissected by mutants. **Plant Physiology**, v. 138, n. 4, p. 2210-2219, 2005.

STADNICK, M. J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Minneapolis, v. 57, n. 1, p. 25-34. 2000.

STAHL EA, BISHOP J.G. Plant-pathogen arms races at the molecular level. **Curr Opin Plant Biol** 3:299–304, 2000.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e o controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, p. 16-21. 1999.

STICHER, L.; MAUCH, M. B.; METRAUX. J. P. Systemic acquired resistance. Palo Alto- USA. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 235-270, 1997.

SUZUKI, TADASHI et al. Site-specific labeling of cytoplasmic peptide: N-glycanase by N, N'-diacetylchitobiose-related compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 31, p. 22152-22160, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6.ed. Porto Alegre: **Artmed**, 888 p, 2017.

TAYLOR, I. et al. A simple in vitro method to measure autophosphorylation of protein kinases. **Plant Methods**, 2013.

TEIXEIRA, P.J.P.L., THOMAZELLA, D.P.T., and PEREIRA, G.A.G. Time for chocolate: Current understanding and new perspectives on cacao witches' broom disease research. **PLoS Pathogens**, 11, 2015.

THAKUR, MEENAKSHI; SOHAL, BRANDON. Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review. **ISRN Biochemistry**. 10.1155/2013/762412. 2013.

Thomma, B. P. H. J., Nu, T., and Joosten, M. H. A. J. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. **Plant Cell** 23, 4–15. 2011.

TOVAR, G. La escoba de bruja del cacao *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer: descripción de síntomas de la enfermedad. **Agronomia Colombiana**, 8: 227-239, 1991.

TRIPATHY, B.C.; OELMÜLLER, R. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. **Plant Signal. Behav.**, 7(12), 1621- 1633, 2012.

VAN LOON, L.C. Pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, 4: 111-116, 1985.

VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review Phytopathology**, 36: 453-483, 1998.

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. 1999.

Vidhyasekaran, P. "PAMP signals in plant innate immunity: signal perception and transduction," in *Signaling and Communication in Plants*, Vol. 21, ed F. Baluška (Dordrecht; Heidelberg; New York, NY; London: Springer), 17–161. 2014.

VIEIRA, D.R.; VALLE, R.R. Indução de resistência sistêmica para o controle da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) (Stahel) Singer em cacaueiros (*Theobroma cacao* L.) dos clones ICS-1 e CCN-51. In: 15º Conferência Internacional de Pesquisas em Cacau, São José, Costa Rica, 2006.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Role of oxidative enzymes in the plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) mediated induced systemic resistance in sugarcane against *Colletotrichum falcatum*/Die Rolle oxidativer Enzyme in der durch

das Pflanzenwachstum fördernde Rhizobakterien (PGPR) induzierten systemischen Resistenz in Zuckerrohr gegen *Colletotrichum falcatum*. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/**Journal of Plant Diseases and Protection**, p. 88-100, 2002.

WALTERS, JAMES W. et al. Serrate–Notch signaling defines the scope of the initial denticle field by modulating EGFR activation. **Developmental biology**, v. 286, n. 2, p. 415-426, 2005.

WALTON, J.D. Biochemical plant pathology. In: Dey, P.M., Harborne, J.B. **Plant Biochemistry**, 1997.

WAN, J.; PENTECOST, G. Potential Application of Chitin Signaling in Engineering BroadSpectrum Disease Resistance to Fungal and Bacterial Pathogens in Plants. **Advances in Crop Science and Technology**, v. 1, n. 2, p. 100-103, 2013.

WANG, J.-J. et al. The effect of the insecticide dichlorvos on esterase activity extracted from the psocids, *Liposcelis bostrychophila* and *L. entomophila*. **Journal of Insect Science**, v. 4, p. 23-28, 2004.

WANG, M. et al. The critical role of potassium in plant stress response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 7370-7390, 2013.

WANG, L. S., LI, W. L., QI, X. W., MA, L., & WU, W. L. Physiological and proteomic response of *Limonium bicolor* to salinity. **Russian journal of plant physiology**, v. 64, n. 3, p. 349-360, 2017.

WARD, E.R., UKNES, S.J., WILLIAMS, S.C., DINCHER, S.S., WIEDERHOLD, D.L., ALEXANDER, D.C., AHL GOY, P., MÉTRAUX, J.-P., RYALS, J.A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **Plant Cell**, 3:1085-1094, 1991.

WHEELER, B.E.J. Plant pathology in a developing world. **Plant Pathology**, v.36, p.430-437. 1987.

XIN, Z., YU, Z., ERB, M., TURLINGS, T. C., WANG, B., QI, J., & LOU, Y. The broad-leaf herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid turns rice into a living trap for a major insect pest and a parasitic wasp. **New Phytologist**, v. 194, n. 2, p. 498-510, 2012.

YODER, O. C.; TURGEON, B. GILLIAN. Fungal genomics and pathogenicity. **Current opinion in plant biology**, v. 4, n. 4, p. 315-321, 2001.

YUE, J., YOU, Y., ZHANG, L., FU, Z., WANG, J., ZHANG, J., & GUY, R. D. Exogenous 24-epibrassinolide alleviates effects of salt stress on chloroplasts and

photosynthesis in *Robinia pseudoacacia* L. seedlings. **Journal of Plant Growth Regulation**, p. 1-14, 2018.

ZAMANY, A.; LIU, J. J.; EKRAMODDOULLAH A. K. Comparative proteomic profiles of *Pinus monticola* needles during early compatible and incompatible interactions with *Cronartium ribicola*. **Planta**, v. 236, p.725–1746, 2012

ZHANG, Y.; LUBBERSTEDT, T.; XU, M. The Genetic and Molecular Basis of Plant Resistance to Pathogens. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 40, Iss. 1, p. 23-35, 2013.

ZHOU, P., MO, X., WANG, W., CHEN, X., & LOU, Y. The Commonly Used Bactericide Bismethiazol Promotes Rice Defenses against Herbivores. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 5, 2018.

ZIMMERLI L, JAKAB G, MÉTRAUX JP, MAUCH-MANI B. Potenciação de mecanismos de defesa específicos de patógenos em *Arabidopsis* pelo ácido β -aminobutírico. **Proc Natl Acad Sci EUA**. 97: 12920-1292, 2000.