

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



ANÁLISE *IN SILICO* E EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS
NA INTERAÇÃO *Theobroma cacao*-*Ceratocystis cacaofunesta*

FREDSON DOS SANTOS MENEZES

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2020

FREDSON DOS SANTOS MENEZES

**ANÁLISE *IN SILICO* E EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS
NA INTERAÇÃO *Theobroma cacao*-*Ceratocystis cacaofunesta***

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

Orientadora: Dra. Fabienne Micheli

Coorientadora: Dra. Karina Gramacho

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2020

M543 Menezes, Fredson dos Santos.
Análise in silico e expressão de genes envolvidos na interação Theobroma cacao-Ceratocystis cacaofunesta / Fredson dos Santos Menezes. – Ilhéus, BA: UESC, 2020.
ix, 95 f. : il.

Orientadora: Fabienne Micheli.
Dissertação (mestrado) –Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.
Referências: f. 77-95.

1. Cacao – Doenças pragas. 2. Fungos. 3. Cacao – Melhoramento genético. I. Título.

CDD 633.74

Dedicatória

Aos meus pais, Flávio de Jesus Menezes e Maria da Conceição dos Santos Menezes (*in memoriam*), pelo amor e carinho incondicional, sendo minha maior fonte de orgulho, força e inspiração.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por ter iluminado meu caminho e proporcionado forças para superar todas as dificuldades encontradas.

À minha orientadora, Dr^a. Fabienne Micheli, pelo apoio, incentivo confiança e conhecimentos compartilhados.

À minha coorientadora, Dr^a. Karina Gramacho, pelo apoio e ensinamentos durante as tarefas desenvolvidas no CEPEC-CEPLAC.

Ao Dr. Raner José, pelo imenso apoio durante todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho, pelas ideias, mensagens de incentivo e conhecimentos compartilhados.

À FAPESB pela concessão da bolsa de mestrado.

À UESC e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela excelência em qualidade de ensino, pesquisa e extensão e pelas infraestruturas laboratoriais, CBG e NBCGIB, que tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CEPEC-CEPLAC, pela infraestrutura cedida para desenvolvimento e condução dos experimentos.

Aos técnicos do CEPEC-CEPLAC, em especial Sr. Zé Reis, Daniel e Eroaldo, pelo apoio durante as tarefas desenvolvidas em campo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados.

À coordenação e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, em especial a Fabrícia Santos e Edmária Alves pelo constante apoio e prestatividade durante a resolução de problemas.

À equipe BIOMOL, pelas contribuições profissionais e momentos de descontração.

A todos os colegas conquistados durante as aulas e trabalhos laboratoriais, pelos momentos de ajuda, aprendizados compartilhados e descontração.

ÍNDICE

EXTRATO.....	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
2.3. Hipótese	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Cacau	4
3.2. <i>Ceratocystis cacaofunesta</i>	5
3.3. Etapas para estabelecimento da patogenicidade.....	7
3.3.2. Inoculação.....	7
3.3.2. Adesão	8
3.3.3. Germinação.....	9
3.3.4. Penetração.....	10
3.3.5. Estabelecimento da infecção	10
3.3.6. Colonização	11
3.4. Prejuízos causados por <i>C. cacaofunesta</i>	12
3.5. Respostas de defesa da planta.....	13
3.5.1. Imunidade desencadeada por PAMPs (PTI).....	14
3.5.2. Imunidade desencadeada por efetores (ETI)	15
3.6. Seleção de genes de defesa do <i>T. cacao</i> ao <i>C. cacaofunesta</i>	16
3.6.1. <i>RECEPTOR-LIKE KINASES</i> (RLKs)	18
3.6.2. <i>DISEASE RESISTENCE RESPONSE PROTEIN 206</i> (DRR206).....	19
3.6.3. <i>BAX-INHIBITOR-1</i> (BI-1).....	20
3.6.4. <i>LRR PROTEIN INTRACELULAR</i> (NB-LRR).....	21
3.6.5. <i>PR5-THAUMATIN LIKE PROTEIN</i> (PR5).....	22
3.6.6. <i>ETHYLENE-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR RAP2</i> (RAP2).....	22
3.7. Expressão gênica	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Seleção de genes.....	25
4.2. Análises <i>in silico</i>	26
4.3. Ontologias gênicas e obtenção de redes de interação proteína-proteína	26

4.4.	Desenho de <i>primers</i>	27
4.5.	Predição das T _m e curvas de dissociação para os <i>amplicons</i>	27
4.6.	Checagem das famílias gênicas	27
4.7.	Alinhamento das sequências e testes <i>in silico</i> para verificar a especificidade dos <i>primers</i>	28
4.8.	Escolha do material vegetal e inoculação	28
4.9.	Escolha dos pontos e coleta do material	29
4.10.	Extração do RNA total	29
4.11.	Tratamento com DNase e síntese de cDNA	30
4.12.	Diluição dos <i>primers</i>	31
4.13.	Escolha dos normalizadores	31
4.14.	Teste dos <i>primers</i>	31
4.15.	Reações de RT-qPCR	32
4.16.	Cálculo de eficiência dos <i>primers</i>	32
4.17.	Cálculo de expressão relativa	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1.	Análises <i>in silico</i>	34
5.2.	Inoculação das plantas	45
5.3.	<i>Primers</i> para RT-qPCR	46
5.4.	T _m e curvas de dissociação preditas <i>in silico</i> para os <i>amplicons</i>	47
5.5.	Checagem das famílias gênicas	48
5.6.	Alinhamento das sequências e teste <i>in silico</i> para verificar a especificidade dos <i>primers</i>	50
5.7.	Extração do RNA total	58
5.8.	Especificidade dos <i>primers</i>	59
5.9.	Eficiência dos <i>primers</i>	62
5.10.	Expressão relativa dos genes selecionados nos genótipos suscetível (CCN51) e resistente (TSH1188), analisando cada ponto de coleta separadamente e comparando cada genótipo ao seu respectivo controle	63
5.11.	Expressão relativa dos genes <i>BI-1</i> , <i>LRR-STK</i> e <i>RAP2</i> , comparando seu comportamento entre os genótipos suscetível (CCN51) e resistente (TSH1188) ao longo de todos os seis pontos de coleta	69
6.	CONCLUSÕES	76
7.	REFERÊNCIAS	77

EXTRATO

MENEZES, Fredson dos Santos. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Fevereiro de 2020. **Análise *in silico* e expressão de genes envolvidos na interação *Theobroma cacao*-*Ceratocystis cacaofunesta***. Orientadora: Dr^a. Fabienne Micheli (Cirad/UESC). Coorientadora: Dr^a. Karina Gramacho (CEPEC/CEPLAC).

O cacaueiro, de origem tipicamente amazônica e principal fonte da matéria-prima para fabricação do chocolate e derivados, apresenta, a nível nacional e internacional, elevada importância socioeconômica e ambiental. No entanto, essa cultura vem sofrendo drásticas reduções em nível de produtividade, principalmente devido ao ataque por fitopatógenos, destacando-se entre estes o fungo *C. cacaofunesta*, um patógeno xilemático, que encontrando hospedeiro suscetível e ambiente favorável, em poucos dias após o estabelecimento da infecção pode matar completamente a planta. Mas, graças ao efetivo sistema imune vegetal, a resistência é considerada regra, e partindo desse princípio, a compreensão da dinâmica dos genes envolvidos nessas respostas abre perspectivas promissoras para o melhoramento genético da espécie. Almejando tal, o objetivo deste trabalho foi estudar, *in silico* e *in vitro*, genes envolvidos nas interações de resistência e suscetibilidade em *Theobroma cacao* – *Ceratocystis cacaofunesta*. Inicialmente, foram selecionados, mediante filtragem de QTLs, mineração de ESTs e revisão em literatura sete genes candidatos a resistência contra *C. cacaofunesta*: *CRK10*, *LRR-STK*, *BI-1*, *DRR206*, *NB-LRR*, *PR5* e *RAP2*, nos quais foram analisados, *in silico*, seus aspectos estruturais, bem como a caracterização de suas respectivas proteínas quanto aos seus aspectos estruturais e bioquímicos, estabelecendo-se também as redes de interações existentes com outras proteínas. Foram avaliados também seus níveis de expressão, por meio de RT-qPCR, nos pontos de 4 horas após inoculação (hai), 24 hai, 48 hai, 72 hai, 7 dias após inoculação (dai) e 15 dai, nos genótipos TSH1188 (resistente) e CCN51 (susceptível) inoculados, ou não, com *C. cacaofunesta*. Mediante as caracterizações realizadas, estabeleceu-se que: as proteínas *CRK10*, *LRR-STK*, *BI-1*, *DRR206*, *NB-LRR*, *PR5* e *RAP2* podem ser consideradas como *hubs*, sendo identificadas complexas redes de interações relacionadas com possíveis respostas de resistência; existem diferenças nos perfis de expressão dos genes *LRR-STK*, *BI-1* e *RAP2* entre os genótipos TSH1188 e CCN51 e entre os tempos estudados; o genótipo TSH1188 apresenta picos de superexpressão dos genes *LRR-STK* e *BI-1* 48 horas após a inoculação com o fungo *C. cacaofunesta*; no genótipo CCN51 ocorre reduções nos níveis de expressão dos genes *LRR-STK*, *BI-1*, *RAP2* e *DRR206* quatro horas após a

inoculação com o fungo *C. cacaofunesta*; às 72 horas após a inoculação com o fungo *C. cacaofunesta*, ocorre uma possível tentativa de resposta de resistência no genótipo suscetível, porém menos intensa e mais tardia quando comparada ao genótipo resistente; e a partir do sétimo dia após a inoculação, inicia-se a externalização dos sintomas de murcha no genótipo CCN51 inoculado com o fungo *C. cacaofunesta*, ocorrendo concomitantemente redução nos níveis de expressão dos genes *BI-1*, *LRR-STK* e *RAP2*.

Palavras chave: agentes patogênicos, efetores, sistema imune, resistência.

ABSTRACT

MENEZES, Fredson dos Santos. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, February of 2020. ***In silico* analysis and expression of genes involved in *Theobroma cacao*-*Ceratocystis cacaofunesta* interaction.** Adviser: Fabienne Micheli (Cirad/UESC). Co-adviser: Karina Gramacho (CEPEC/CEPLAC).

The cacao tree, from typical Amazonian origin and the main source of the raw material for the chocolate and derivative manufacture, has a high socioeconomic and environmental importance, both nationally and internationally. However, this culture has been suffering drastic reductions at productivity level, mainly due to the attack by phytopathogens. Among them, the fungus *C. cacaofunesta*, a xylemic pathogen, is able to establish infection and to completely kill the plant in a few days, when finding a susceptible host and favorable environment. But, due to the effective plant immune system, resistance is considered a rule. Based on this principle, understanding the dynamics of the genes involved in the resistance responses opens up promising perspectives for the genetic improvement of the plant species. The objective of this work is to study, *in silico* and *in vitro*, genes involved in the resistant and susceptible *Theobroma cacao* - *Ceratocystis cacaofunesta* interactions. Initially, seven candidate genes for plant resistance to *C. cacaofunesta* were selected by analyzing QTLs, mining ESTs and reviewing the literature. These genes, *CRK10*, *LRR-STK*, *BI-1*, *DRR206*, *NB-LRR*, *PR5* and *RAP2* were analyzed *in silico* regarding their structural aspects, as well as the characterization of their respective proteins at structural and biochemical levels, also establishing an interaction network with other proteins. The expression level of these genes were also evaluated by RT-qPCR 4 hours after inoculation (hai), 24 hai, 48 hai, 72 hai, 7 days after inoculation (dai) and 15 dai in the TSH1188 (resistant) and CCN51 (susceptible) genotypes inoculated or not with *C. cacaofunesta*. We showed that: *CRK10*, *LRR-STK*, *BI-1*, *DRR206*, *NB-LRR*, *PR5* and *RAP2* proteins can be considered as hubs, with complex networks of interactions related to possible resistance responses being identified; there are differences in the expression profiles of the *LRR-STK*, *BI-1* and *RAP2* genes between the TSH1188 and CCN51 genotypes and between studied times; the TSH1188 genotype shows overexpression of the *LRR-STK* and *BI-1* genes 48 hours after inoculation with the fungus *C. cacaofunesta*; in the CCN51 genotype occurs reductions in the expression levels of the *LRR-STK*, *BI-1*, *RAP2* and *DRR206* genes four hours after inoculation with the fungus *C. cacaofunesta*; at 72 hours after inoculation with the fungus *C. cacaofunesta*, there is a possible attempted resistance response in the

susceptible genotype, but less intense and later when compared to the resistant genotype; and from the seventh day after inoculation, the externalization of wilt symptoms begins in the CCN51 genotype inoculated with the fungus *C. cacaofunesta*, with a simultaneous reduction in the levels of expression of the genes *BI-1*, *LRR-STK* and *RAP2*.

Keywords: pathogens, effectors, immune system, resistance.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sintomas em plantas de *T. cacao* infectadas por *C. cacaofunesta*. A) Sintomas microscópicos, manifestados através da obstrução dos vasos xilemáticos (SANTOS et al, 2013a); B) Sintomas macroscópicos, manifestando-se pela externalização dos sintomas de murcha, desencadeando a morte da planta (CÔRREA, 2019). 6
- Figura 2.** Modelo Zig-Zag do sistema imune vegetal, demonstrando a ativação das respostas de Imunidade Desencadeada por PAMPs (PTI), Suscetibilidade Desencadeada por Efetores (ETS) e Imunidade Desencadeada por Efetores (ETI) (JONES; DANGL, 2006). 14
- Figura 3.** Proteínas dos respectivos genes selecionados via minerações em biblioteca de ESTs, dados de QTLs e revisão em literatura. Sendo: *Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase (LRR-STK)*, *Putative Cysteine-rich receptor-like protein kinase 25 (CRK10)*; *Disease Resistance Response protein 206 (DDR206)*; *Bax-inhibitor-1 (BI-1)*; *LRR-protein intracelular (NB-LRR)*; *thaumatin-like protein (PR5)* e *Ethylene-responsive transcription factor RAP2 (RAP2)*. 18
- Figura 4.** Metodologia para seleção dos genes *PR5*, o *BI-1* e a *DDR206* através da mineração em biblioteca de ESTs. 25
- Figura 5.** Metodologia para seleção dos genes *CRK10*, *LRR-STK* e *NB-LRR* através da mineração em dados de QTLs. 26
- Figura 6.** Procedimento de inoculação do fungo *C. cacaofunesta* nos genótipos TSH1188 e CCN 51 de *T. cacao*: a) incisão, com auxílio de bisturi, do tecido a ser inoculado; b) deposição do inóculo no local da incisão; c) inserção de algodão umedecido logo abaixo do local da inoculação; d) vedação com fita plástica aderente (veda-rosca). 29
- Figura 8.** Representação das estruturas dos genes selecionados, explanando seus respectivos tamanhos em pb e composições de éxons e íntrons. 34
- Figura 9.** Rede de interação da proteína *CRK10* em *A. thaliana*, ortóloga da *CRK10* de *T. cacao*. 40
- Figura 10.** Rede de interação da proteína *RHS16* em *A. thaliana*, ortóloga da *LRR-STK* de *T. cacao*. 41
- Figura 11.** Rede de interação da proteína *BI-1* em *A. thaliana*, ortóloga da *BI-1* de *T. cacao*. 41
- Figura 12.** Rede de interação da proteína *AT2G39430* em *A. thaliana*, ortóloga da *DDR206* de *T. cacao*. 42
- Figura 13.** Rede de interação da proteína *AT3G15410* em *A. thaliana*, ortóloga da *NB-LRR* de *T. cacao*. 43
- Figura 14.** Rede de interação da proteína *OSM34* em *A. thaliana*, ortóloga da *PR5* 43

de *T. cacao*.

Figura 15. Rede de interação da proteína *RAP2.2* em *A. thaliana*, ortóloga da *RAP2* de *T. cacao*. 44

Figura 16. Sintomas manifestados pelos genótipos CCN51 (A) e TSH1188 (B) de *T. cacao* 15 dias após a infecção pelo fungo *C. cacaofunesta*. 45

Figura 17. Sintomas manifestados pelo genótipo CCN51 (A) de *T. cacao* inoculados com o fungo *C. cacaofunesta*. Sintomas de murcha aos 7 dai (A), murcha acentuada a 15 dai (B) e obstrução dos vasos xilemáticos (C e D). 46

Figura 18. Tm e curvas de dissociação preditas para os amplicons gerados pelos sete pares de *primers* utilizados: GAPDH, MDH, BI-1, CRK, DRR206, LRR-STK2, RAP2 e NB-LRR. 47

Figura 19. Alinhamento dos genes identificados na família gênica do *BI-1*. Sendo destacado o gene o gene selecionado para este trabalho e o respectivo local onde foi desenhado o par de *primer*. 50

Figura 20. Alinhamento dos genes identificados na família gênica do *NB-LRR*. Sendo destacado o gene o gene selecionado para este trabalho e o respectivo local onde foi desenhado o par de *primer*. 50

Figura 21. Alinhamento dos genes identificados na família gênica do *LRR-STK*. Sendo destacado o gene o gene selecionado para este trabalho e o respectivo local onde foi desenhado o par de *primer*. 51

Figura 22. Alinhamento dos genes identificados na família gênica do *DRR206*. Sendo destacado o gene o gene selecionado para este trabalho e o respectivo local onde foi desenhado o par de *primer*. 52

Figura 23. Alinhamento dos genes identificados na família gênica do *CRK*. Sendo destacado o gene o gene selecionado para este trabalho e o respectivo local onde foi desenhado o par de *primer*. 53

Figura 24. Alinhamento dos genes identificados na família gênica do *RAP2*. Sendo destacado o gene o gene selecionado para este trabalho e o respectivo local onde foi desenhado o par de *primer*. 54

Figura 25. *PrimerBlaster* no genoma para verificação da especificidade dos *primers* GAPDH, MDH, BI-1, DRR206, LRR-STK2, CRK, NB-LRR e RAP2, sendo destacado na cor amarela os locais, em cada gene, onde foram desenhados. 57

Figura 26. Eletroforese para as 24 amostras de RNA total. Sendo: Marcador (M), CCN51-I (inoculado)-4 (horas após a inoculação) hai (1), CCN51-NI (não inoculado)-4hai (2), TSH1188-I-4hai (3), TSH1188-NI-4hai (4), CCN51-I-24hai (5), CCN51-NI-24hai (6), TSH1188-I-24hai (7), TSH1188-NI-24hai (8), CCN51-I-48hai (9), CCN51-NI-48hai (10), TSH1188-I-48hai (11), TSH1188-NI-48hai (12), CCN51-I-72hai (13), CCN51-NI-72hai (14), TSH1188-I-72hai (15), TSH1188-NI-72hai (16), CCN51-I-7 (dias após a inoculação) dai (17), CCN51-NI-7dai (18), TSH1188-I-7dai (19), TSH1188-NI-7dai (20), CCN51-I-15dai (21), CCN51-NI- 59

15dai (22), TSH1188-I-15dai (23) e TSH1188-NI-15hai (24).

Figura 27. Tm e curvas de dissociação dos *amplicons* gerados pelos pares de *primers* utilizados: GAPDH, MDH, BI-1, CRK, DRR206, LRR-STK2, RAP2 e NB-LRR. 60

Figura 28. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos fragmentos amplificados pelos *primers* utilizados: GAPDH, MDH, BI-1, DRR206, NB-LRR, LRR-STK2, RAP2 e CRK. 62

Figura 29. Dados de expressão relativa, calculados no *software* REST-2009, dos genes *BI-1*, *LRR-STK*, *RAP2* e *DRR206* para o ponto de 4 hai nos genótipos TSH1188 (resistente) e CCN51 (suscetível). 64

Figura 30. Dados de expressão relativa, calculados no *software* REST-2009, dos genes *BI-1*, *LRR-STK* e *RAP2* para o ponto de 24 hai nos genótipos TSH1188 (resistente) e CCN51 (suscetível). 65

Figura 31. Dados de expressão relativa, calculados no *software* REST-2009, dos genes *BI-1*, *LRR-STK* e *RAP2* para o ponto de 48 hai nos genótipos TSH1188 (resistente) e CCN51 (suscetível). 66

Figura 32. Dados de expressão relativa, calculados no *software* REST-2009, dos genes *BI-1*, *LRR-STK*, *RAP2* e NB-LRR para o ponto de 72 hai nos genótipos TSH1188 (resistente) e CCN51 (suscetível). 67

Figura 33. Dados de expressão relativa, calculados no *software* REST-2009, dos genes *BI-1*, *LRR-STK*, *RAP2* e NB-LRR para o ponto de 7 dai nos genótipos TSH1188 (resistente) e CCN51 (suscetível). 68

Figura 34. Dados de expressão relativa, calculados no *software* REST-2009, dos genes *BI-1*, *LRR-STK*, *RAP2* para o ponto de 15 dai nos genótipos TSH1188 (resistente) e CCN51 (suscetível). 69

Figura 35. Dados de expressão relativa, calculados no *software* REST-2009, do gene *BI-1* ao longo dos seis pontos de coleta nos genótipos TSH1188 (resistente) e CCN51 (suscetível), sendo feita a comparação dos níveis de expressão do *BI-1*, em cada genótipo separadamente, ao longo dos pontos de coleta; e comparando a expressão do *BI-1* entre o genótipo TSH1188 e CCN51 em cada ponto de coleta específico. As letras maiúsculas foram utilizadas para comparar a expressão do *BI-1* EM CADA GENÓTIPO, separadamente, AO LONGO DOS PONTOS DE COLETA. As letras minúsculas foram utilizadas para realizar a comparação ENTRE OS GENÓTIPOS, TSH1188 e CCN51, EM CADA PONTO DE COLETA ESPECÍFICO. 70

Figura 36. Dados de expressão relativa, calculados no *software* REST-2009, do gene *LRR-STK* ao longo dos seis pontos de coleta nos genótipos TSH1188 (resistente) e CCN51 (suscetível), sendo feita a comparação dos níveis de expressão do *LRR-STK*, em cada genótipo separadamente, ao longo dos pontos de coleta; e comparando a expressão do *LRR-STK* entre o genótipo TSH1188 e CCN51 em cada ponto de coleta específico. As letras maiúsculas foram utilizadas 72

para comparar a expressão do *LRR-STK* EM CADA GENÓTIPO, separadamente, AO LONGO DOS PONTOS DE COLETA. As letras minúsculas foram utilizadas para realizar a comparação ENTRE OS GENÓTIPOS, TSH1188 e CCN51, EM CADA PONTO DE COLETA ESPECÍFICO.

Figura 37. Dados de expressão relativa, calculados no *software* REST-2009, do gene *RAP2* ao longo dos seis pontos de coleta nos genótipos TSH1188 (resistente) e CCN51 (suscetível), sendo feita a comparação dos níveis de expressão do *RAP2*, em cada genótipo separadamente, ao longo dos pontos de coleta; e comparando a expressão do *RAP2* entre o genótipo TSH1188 e CCN51 em cada ponto de coleta específico. As letras maiúsculas foram utilizadas para comparar a expressão do *RAP2* EM CADA GENÓTIPO, separadamente, AO LONGO DOS PONTOS DE COLETA. As letras minúsculas foram utilizadas para realizar a comparação ENTRE OS GENÓTIPOS, TSH1188 e CCN51, EM CADA PONTO DE COLETA ESPECÍFICO.

74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações, em ng/μl, das 24 amostras de RNA total e volumes, em μl, utilizados de Mix, água e RNA total nas reações de tratamento para eliminação de DNA genômico.	30
Tabela 2. Informações estruturais dos genes selecionados: <i>CRK10</i> , <i>LRR-STK</i> , <i>BI-1</i> , <i>DDR206</i> , <i>NB-LRR</i> , <i>PR5</i> e <i>RAP2</i> .	34
Tabela 3. Dados provenientes das análises <i>in silico</i> das proteínas <i>LRR-STK</i> , <i>CRK10</i> , <i>BI-1</i> , <i>DDR206</i> , <i>NB-LRR</i> , <i>PR5</i> e <i>RAP2</i> quanto ao seu tamanho, em número de aminoácidos (aa); presença de peptídeo sinal, em número de aminoácidos (aa); ponto isoelétrico; peso molecular, em kDa; e presença de sítios de glicosilação (N), acetilação e fosforilação.	37
Tabela 4. Localização celular das proteínas <i>LRR-STK</i> , <i>CRK25</i> , <i>BI-1</i> , <i>DDR206</i> , <i>NB-LRR</i> , <i>PR5</i> e <i>RAP2</i> .	38
Tabela 5. Proteínas ortólogas selecionadas no genoma de <i>A. thaliana</i> e suas respectivas taxas de cobertura e identidade.	39
Tabela 6. Dados referentes aos <i>primers</i> para RT-qPCR desenhados: <i>BI-1</i> , <i>CRK</i> , <i>DDR206</i> , <i>LRR-STK2</i> , <i>NB-LRR</i> e <i>RAP2</i> .	46
Tabela 7. Identificação dos membros da família gênica a qual pertence cada um dos genes selecionados.	48
Tabela 8. Concentrações, em ng/μl, do RNA total e absorbância 260/280 para os 24 tratamentos.	58
Tabela 9. Eficiência dos <i>primers</i> GAPDH (normalizador), MDH (normalizador), <i>BI-1</i> , <i>DDR206</i> , <i>NB-LRR</i> , <i>LRR-STK2</i> , <i>RAP2</i> e <i>CRK</i> .	63

1. INTRODUÇÃO

O cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta oriunda da Bacia Amazônica Superior adaptada para cultivo em condições de clima tropical chuvoso, sendo pomares comerciais atualmente encontrados em latitudes entre 20°S e 20°N (GARDEA et al., 2018; HARDY, 1960; SANTOS et al., 2015). No Brasil, mediante autorização, os primeiros plantios oficiais tiveram início em 1679. Passaram-se alguns anos, e em 1746 essa cultura foi introduzida na Bahia, mais precisamente no município de Canavieiras, onde encontrou condições ideais de clima e solo. Em Ilhéus, o cultivo de cacau para fins comerciais iniciou a partir 1752, sendo as amêndoas, durante algumas décadas, o principal produto exportado pela Bahia. Gerando lucros expressivos para os produtores, fornecendo empregos diretos e indiretos para trabalhadores rurais, auxiliando na manutenção da biodiversidade mediante cultivo em sistema ‘cabruca’ e sendo até fonte de inspiração para escritores, o cacaueiro, principal fonte de matéria-prima para fabricação de chocolates e derivados, tornou-se ator principal não apenas na história econômica, mas também nos cenários social, ambiental e cultural desse estado (ROCHA, 2008; SANTOS et al., 2015; VELLO; GARCIA, 1971).

No entanto, *T. cacao* encontra-se atualmente sob ameaça, principalmente decorrente de ataque por fitopatógenos, sendo previstas crises de escassez e em cenários mais catastróficos especulam-se até possível risco de extinção da espécie, o que pode ocorrer daqui a quatro décadas (BBC, 2018). A nível nacional, sobretudo no sul da Bahia, essa cultura vem sofrendo perdas drásticas em níveis de produtividade devido às infecções por *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *Ceratocystis cacaofunesta* (OLIVEIRA, 2017). Descoberta em pomares comerciais pela primeira vez na Bahia em 1998, a murcha-de-Ceratocystis é uma das doenças mais severas dos cacauais, podendo ser capaz de matar completamente a planta em poucas semanas após sua infecção, sendo facilmente disseminada por equipamentos e/ou ferramentas contaminadas (BEZERRA et al., 1998; OLIVEIRA, 2017). Podendo afetar mais de 50 famílias de angiospermas, seus sintomas característicos são murcha, amarelecimento e seca das folhas, permanecendo estas aderidas à planta por algumas semanas, mesmo após morte vegetal (OLIVEIRA, 2017; SANTOS et al., 2013a).

Ceratocystis cacaofunesta é um patógeno necrotrófico capaz de secretar um amplo conjunto de efetores, que na ausência de reconhecimento, podem infectar as células vegetais e desencadear os sintomas característicos da doença (MOLANO et al.,

2018; SANTOS et al., 2013a). Estabelecendo uma interação compatível com o *T. cacao*, *C. cacaofunesta* tem ocasionado perdas significativas em plantações, principalmente devido aos cultivos comerciais serem estabelecidos com genótipos resistentes à *M. perniciosa*, os quais geralmente são suscetíveis à murcha-de-Ceratocystis (SILVA; LUZ, 2000). Por outro lado, genótipos de *T. cacao* resistentes a *C. cacaofunesta* podem ser capazes de reconhecer esses efetores, principalmente por meio de proteínas localizadas na superfície da membrana plasmática (ARGOUT et al., 2008; FERNANDES et al., 2018; JONES; DANGL, 2006; SANTOS et al., 2012a), desencadeando respostas de defesa, podendo sua eficiência ser diretamente proporcional à precocidade do reconhecimento (JONES; DANGL, 2006; KATAGIRI; TSUDA, 2010). Em trabalhos envolvendo genótipos cultivados na Bahia, foram definidos como padrões de resistência e suscetibilidade os genótipos TSH1188 e CCN51, respectivamente, os quais são comumente utilizados em estudos da interação entre *T. cacao* – *C. cacaofunesta* (OLIVEIRA et al., 2009; SANCHES et al., 2008), visando principalmente identificar genes potencialmente envolvidos no desencadeamento de respostas de resistência (ARGOUT et al., 2008; FERNANDES et al., 2018; LANAUD et al., 2009; SANTOS et al., 2012a; SANTOS, 2012; SANTOS et al., 2013b).

Mediante essas circunstâncias, torna-se cada vez mais importante o desenvolvimento de trabalhos, sobretudo nas áreas de pós-genômica, visando compreender a dinâmica da interação planta-patógeno, alcançando resultados que posteriormente podem servir como base para programas de melhoramento genético da espécie. Almejando tal perspectiva, o objetivo deste trabalho é estudar, *in silico* e *in vitro*, genes envolvidos nas interações de resistência e suscetibilidade em *Theobroma cacao* – *Ceratocystis cacaofunesta*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar, *in silico* e *in vitro*, genes envolvidos nas interações de resistência e suscetibilidade em *Theobroma cacao* – *Ceratocystis cacaofunesta*.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Selecionar genes candidatos à resistência ao fungo *C. cacaofunesta*;
- ✓ Analisar a estrutura dos genes selecionados e caracterizar suas proteínas quanto a aspectos estruturais e bioquímicos;
- ✓ Estabelecer rede de interação para cada uma das proteínas estudadas;
- ✓ Identificar o perfil de expressão dos genes candidatos em genótipos resistente (TSH1188) e suscetível (CCN51) inoculados (ou não) com *C. cacaofunesta*.

2.3. Hipótese

Os genes *BI-1*, *DRR206*, *NB-LRR*, *CRK*, *LRR-STK*, *RAP2* e *PR5* estão envolvidos no desencadeamento de respostas de defesa do cacaueiro contra *C. cacaofunesta*, sendo diferencialmente expressos entre interações resistente e suscetível.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Cacau

O cacaueiro, pertencente à família Malvaceae e espécie *T. cacao* L. (BAYER; KUBITZKI, 2003; BHATTACHARJEE, 2018), é considerada uma planta tropical, tendo como seu centro de origem a Bacia Amazônica Superior, mais precisamente próximo aos Andes, sendo encontrado em seu estado selvagem do Peru até o México (GARDEA et al., 2018; NAKAYAMA, et al., 1996). Ele é considerado como uma cultura de elevada importância econômica, social e ambiental, principalmente para a África, América, Ásia e Oceania (ICCO, 2019).

Atualmente, estima-se que a produção mundial de cacau gira em torno de 4.649.000 toneladas, da qual o continente africano é o maior responsável, representando cerca de 75% desta, destacando-se Costa do Marfim e Gana, que juntos colaboram com mais de 80% da produção continental africana. Em seguida, temos a América, encarregando-se com pouco mais de 17%, onde Equador e Brasil se sobressaem, participando conjuntamente com mais ou menos 60% de toda a produção americana (ICCO, 2019). Em cenário nacional, no Brasil, os principais estados produtores são a Bahia e o Pará, produzindo 122,5 e 116,1 mil toneladas, respectivamente. Esses dados representam quase 95% de toda produção interna brasileira (IBGE, 2019).

Sendo a principal fonte de matéria-prima para a fabricação do chocolate, o cacau representa expressiva importância social, sobretudo para os continentes supracitados. Segundo a *World Cocoa Foundation* (2014) de 80 a 90% de toda produção mundial de cacau é oriunda de pequenas propriedades familiares, o que engloba em torno de cinco a seis milhões de agricultores ao redor do mundo, sendo além de uma fonte de renda uma maneira de garantir a permanência do homem no campo, ocasionando consequentemente a diminuição do êxodo rural.

A cacaucultura representa ainda significativa importância ambiental. Além da alta rentabilidade econômica, esta atividade auxilia na restauração agroflorestal de áreas degradadas, que ao serem transformadas em Sistemas Agroflorestais, cultivando-se cacau juntamente com outras espécies florestais, contribuem com a manutenção da biodiversidade e sequestro de carbono, e garantem a alta produtividade e lucratividade da terra (THE NATURE CONSERVANCY, 2017).

Torna-se evidente que o cacaueiro representa a nível nacional e internacional uma grande importância econômica, social e ambiental. Porém, essa cultura tem sido

altamente afetada por doenças, destacando-se dentre elas a causada pelo patógeno necrotrófico *Ceratocystis cacaofunesta*, que desencadeia a popularmente chamada murcha-de-Ceratocystis ou Mal-do-Facão, a qual pode matar completamente a planta afetada, gerando conseqüentemente reduções significativas na produtividade desta cultura.

3.2. *Ceratocystis cacaofunesta*

A murcha-de-Ceratocystis, também conhecida como Mal-do-Facão, é causada pelo fungo ascomiceto *Ceratocystis cacaofunesta* (CABRERA et al., 2016; ENGELBRECHT; HARRINGTON, 2005), o qual pertence ao filo Ascomycota e a família Ceratocystidaceae (MYCOBANK, 2019).

Inicialmente acreditava-se que a murcha-de-Ceratocystis era ocasionada exclusivamente pela espécie *C. fimbriata* (BAKER et al., 2003). No entanto, em trabalhos envolvendo análises moleculares, estabeleceu-se que *C. cacaofunesta* apresenta uma maior especificidade ao cacau. Foi estabelecido, que essa espécie apresenta determinadas características que a distingue da *C. fimbriata*, tais como: diferenças morfológicas, maior patogenicidade ao cacau, sequências ITS-rDNA e intersterelidade com outros membros do clado latino-americano da espécie (ENGELBRECHT; HARRINGTON, 2005). A comparação dos proteomas dessas espécies mostrou alta homologia, sugerindo que a especialização adquirida pode ser devido a pequenas variações genéticas. No entanto, foram encontradas diferenças na quantidade de elementos transponíveis, mostrando-se uma expansão cinco vezes maior no genoma de *C. cacaofunesta* quando comparado ao *C. fimbriata*, o que pode provocar importantes modificações na estrutura, função e adaptação do *C. cacaofunesta*, fazendo assim que a haja um incremento na variabilidade entre as duas espécies (MOLANO et al., 2018).

Essa doença foi relatada pela primeira vez no Equador (RORER, 1918), sendo que a partir de 1950, foi encontrada de forma epidêmica em outros países sul e centro-americanos e nas ilhas de Haiti e Trinidad (SILVA et al., 2004). No Brasil, descobriu-se primeiramente em Rondônia (BASTOS; EVANS, 1978), e aproximadamente duas décadas após, sua ocorrência foi descrita no sul da Bahia (BEZERRA et al., 1998). Em estudo realizado pelo CEPEC-CEPLAC, observou-se que essa doença se disseminou amplamente no território baiano, sendo relatada sua ocorrência em 42 fazendas

distribuídas em 22 municípios, destacando-se Uruçuca, onde foi apresentada a maior taxa de incidência (ALMEIDA et al., 2005).

Sua infecção é facilitada por meio de ferimentos no caule da planta, decorrentes principalmente de práticas de manejo executadas na lavoura, tais como colheitas de frutos, podas, desbrotas e limpeza do solo. Essas aberturas facilitam a penetração do patógeno na planta, e posterior colonização do tecido afetado. Sua disseminação ocorre através de ferramentas e equipamentos contaminados, podendo ainda ser transportado por meio de insetos, sobretudo por besouros que perfuram a madeira, mais especificamente dos gêneros *Xyleborus* e *Xylosandrus* (CABRERA et al., 2016; OLIVEIRA; LUZ, 2005).

Considerado como patógeno tipicamente de xilema, *C. cacaofunesta* desenvolve-se inicialmente no câmbio vascular (BAKER; HARRINGTON, 2004). Os sintomas manifestam-se principalmente na parte aérea das plantas, caracterizando-se por murchas com posterior amarelecimento e seca de galhos, sendo uma particularidade dessa infecção o fato de que as folhas secam e morrem, mas permanecem aderidas à planta durante algumas semanas (OLIVEIRA; LUZ, 2005; SANTOS et al., 2013a), como podem ser observados na Figura 1.

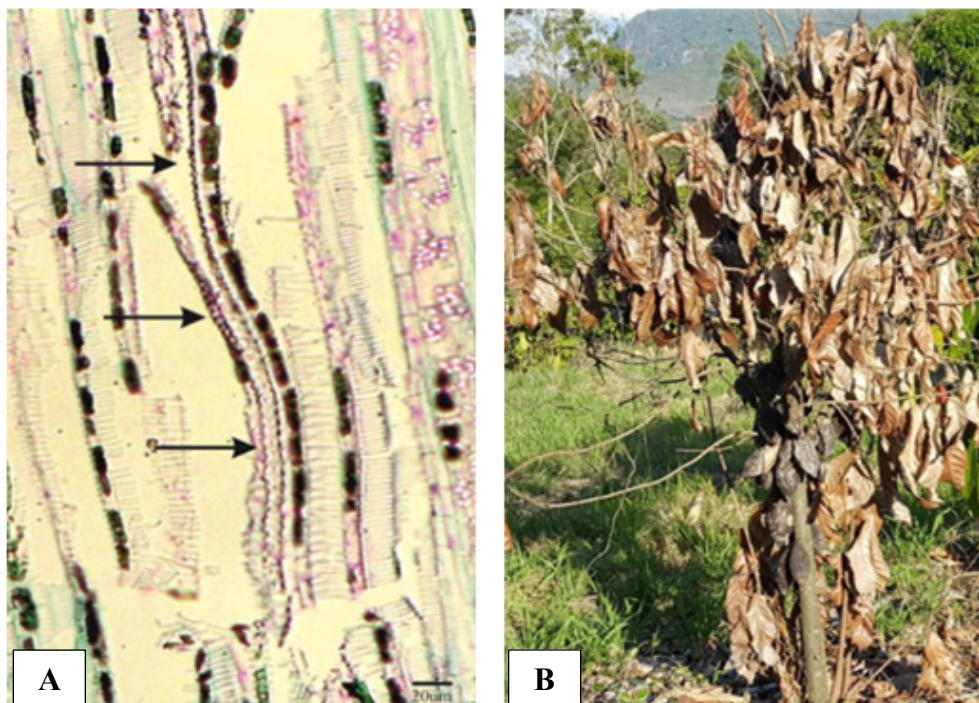


Figura 1. Sintomas em plantas de *T. cacao* infectadas por *C. cacaofunesta*. A) Sintomas microscópicos, manifestados através da obstrução dos vasos xilemáticos (SANTOS et al, 2013a); B) Sintomas macroscópicos, manifestando-se pela externalização dos sintomas de murcha, desencadeando a morte da planta (CÔRREA, 2019).

Em tecidos lenhosos, são observadas lesões necróticas em forma de cancro, iniciando-se a partir do ponto de infecção, assumindo ainda uma coloração castanho-avermelhada ou púrpura, decorrente da exsudação de um líquido escuro, resultante da oxidação e polimerização de compostos fenólicos. Visualmente, também é possível notar a exteriorização de uma coloração escura, a qual manifesta-se na casca da planta afetada. Tais sintomas estendem-se para baixo e para cima nos locais onde houve a penetração, diminuindo a intensidade em direção aos tecidos sadios (BERGAMIN FILHO et al.; 1995; OLIVEIRA; LUZ, 2005; OLIVEIRA et al., 2013, SANTOS et al., 2013a). Microscopicamente, pode observar-se a descoloração do xilema, a qual evolui progressivamente até os 15 dias após a infecção pelo patógeno, sobretudo nos genótipos suscetíveis, sendo este sintoma uma combinação da tentativa de resposta de defesa do hospedeiro e da pigmentação das hifas e esporos do patógeno (SANTOS et al., 2013a).

Esses sintomas provocados pelo *C. cacaofunesta* são complexos e podem ter diferentes causas. Acredita-se que uma das principais é a descontinuidade na translocação xilemática da água absorvida via sistema radicular, decorrente principalmente da obstrução dos vasos pelo crescimento micelial do fungo. Consequentemente pode ocasionar na morte da planta, da qual em ambientes favoráveis o patógeno beneficia-se do tecido em decomposição para crescer e posteriormente reproduzir-se (BERGAMIN FILHO et al.; 1995; TUMURA et al; 2012).

3.3. Etapas para estabelecimento da patogenicidade

Para ocorrência dos sintomas supracitados são necessárias três condições básicas: hospedeiro suscetível, patógeno virulento e ambiente favorável. Sendo essas exigências atendidas, o patógeno é capaz de estabelecer as principais etapas de patogenicidade na planta, iniciando-se a partir da inoculação, adesão, germinação, penetração, estabelecimento da infecção e findando com a colonização do hospedeiro, ressaltando-se que após a colonização, patógenos necrotróficos são capazes de matar as células para adquirir nutrientes, reproduzindo-se e tornando-se aptos a iniciar um novo ciclo de infecção (AGRIOS, 2005; BERGAMIN FILHO et al., 1995).

3.3.2. Inoculação

A inoculação é considerada como o contato inicial do inóculo, podendo ser os esporos ou fragmentos de micélio fúngicos, no local do hospedeiro onde é possível o desencadeamento da infecção (AGRIOS, 2005). Tratando-se especificamente de *C.*

cacaofunesta, o inóculo pode ser em forma de conídios ou ascósporos, que podem ser transportados por insetos ou ferramentas de trabalho. Os conídios são os esporos assexuais formados durante a fase anamórfica, ocorrendo na extremidade de hifas especializadas, denominadas conidióforos, a construção de uma parede anelar com posterior dissociação dessa estrutura terminal (AGRIOS, 2005; HARRINGTON, 2009). Nessa fase são produzidos dois tipos de esporos, os conídios propriamente ditos, que são hialinos, cilíndricos e catenulados, e os aleuroconídios terminais, em cadeias, obovatos a ovais, com paredes espessas e coloração castanha (JONES, 1967; LAWRENCE et al., 1991; MORGAN). Já os ascósporos são os esporos sexuais produzidos no interior de uma célula zigótica denominada *ascus*, a qual apresenta uma estrutura semelhante a um saco e que estão organizados dentro do peritécio. Os ascósporos são hialinos, unicelulares e apresentam uma aparência análoga a um chapéu (AGRIOS 2005; ENGELBRECHT; HARRINGTON, 2005).

3.3.2. Adesão

Antes de iniciar os processos de penetração e colonização, a grande parte dos fungos fitopatogênicos precisam aderir-se ao hospedeiro, sendo esse contato inicial mais especificamente estabelecido na superfície externa dos órgãos vegetais. Esse é um processo complexo, mas característico para grande parte dos fungos em algum estágio do seu ciclo de vida, sendo esta uma etapa essencial para assegurar sua sobrevivência e para o estabelecimento da patogenicidade (AGRIOS, 2005; JONES, 1994; NICHOLSON; EPSTEIN, 1991).

O contato inicial dos esporos fúngicos com a planta pode ocorrer de forma passiva ou ativa. Passivamente, quando são aprisionados ou aderem-se à superfície com o auxílio de apêndices adesivos, e ativamente, quando são estimulados a produzir algum tipo de mucilagem adesiva (JONES, 1994). Essas substâncias adesivas apresentam uma ampla gama de variação em sua composição, dependendo tanto da espécie fitopatogênica quanto das condições de ambiente envolvidas (EPSTEIN; NICHOLSON, 1997).

A maioria dos fungos apresentam uma fixação inicial que ocasiona posteriormente na produção dos tubos germinativos e ao ocorrer o contato das hifas com a superfície do hospedeiro são formadas a bainha hifal, sendo que alguns ainda têm a capacidade de desenvolver apressórios (JONES, 1994). As moléculas adesivas dos fungos na superfície do hospedeiro são importantes para o tigmotropismo e para sua

posterior diferenciação (CHAKY et al., 2001; EPSTEIN et al., 1985); facilitam a interação química entre patógeno e o hospedeiro (JONES; EPSTEIN, 1990); são requeridas para penetração no hospedeiro via mecanismo de pressão (BECHINGER et al., 1999); evitam, após aderidos, o deslocamento do patógeno pela água e/ou pelo vento (EPSTEIN; NICHOLSON, 1997) e aumentam a superfície de contato com o hospedeiro (APOGA et al., 2004).

Tratando-se especificamente de *C. cacaofunesta*, em análise de dados de secretoma foram encontradas 10 proteínas preditas como '*Extracellular Serine-rich Protein*' e em identificação por meio de espectrometria de massas encontrou-se mais duas, sendo uma anotada '*Ceratoplatanin*' e outra como '*Extracellular Serine-rich Protein*', acreditando-se que estas desempenham possível papel relacionado com a adesão celular (MOLANO et al., 2018).

3.3.3. Germinação

Após aderidos, para que os fungos sejam capazes de penetrar e iniciar uma infecção no hospedeiro é necessário que ocorra primeiramente a germinação dos seus esporos, sendo este um processo complexo, não totalmente compreendido e que varia entre as espécies (AGRIOS, 2005; SEPHTON-CLARK; VOELZ, 2018). O sucesso deste evento desencadeia na formação de estruturas especializadas, podendo ser por exemplo, o crescimento hifal (AKIYAMA, et al., 2005), a formação de apressórios (SOANES et al., 2012), haustórios (YOSHIDA et al., 2016), hifopódios (ONYILE, et al., 1987) e/ou almofadas de infecção (BACKHOUSE; WILLETTS, 1987).

Para que a germinação se inicie é necessário que tanto as condições internas quanto as externas sejam ideais. Internamente, pode ser essencial a remoção de autoinibidores, como por exemplo o *methyl 3,4-dimethoxycinnamate* no fitopatógeno *Uromyces phaseoli* (MACKO et al., 1970). Externamente, pode-se citar a luz, temperatura, disponibilidade de água e nutrientes, presença de moléculas sinalizadoras, pH e osmolaridade (VAN LONG et al., 2017).

Durante o processo germinativo, os esporos até então dormentes começam a tornar-se ativos metabolicamente, caracterizando-se por alterações estruturais e fisiológicas, tais como mudanças nos níveis transcricionais, no metabolismo, na composição da parede celular e na fisiologia celular, as quais atuando conjuntamente desencadeiam o aumento de tamanho dos esporos, que conseqüentemente leva ao crescimento das hifas (SEPHTON-CLARK; VOELZ, 2018).

Considerado como um fungo oportunista, uma vez que o *C. cacaofunesta* entra em contato direto com o tecido alvo do hospedeiro não é observada a formação de estruturas de penetração, como por exemplo, apressórios ou haustórios. Estando no interior do hospedeiro e encontrando as condições favoráveis, ocorre a germinação dos conídios, sendo provavelmente desencadeada também pela liberação de exsudatos pela planta hospedeira (CABRERA et al., 2016; SANTOS et al., 2013a).

3.3.4. Penetração

Podendo acontecer antes ou na maioria dos casos após a germinação das estruturas de infecção, a penetração fúngica pode ocorrer diretamente nas paredes celulares mediante estruturas especializadas e/ou indiretamente através de aberturas naturais ou por meio de feridas (AGRIOS, 2005). Em algumas situações acontece ainda a degradação enzimática das paredes celulares dos hospedeiros, facilitando assim o processo de penetração pelo patógeno (CRAGG et al., 2015).

O fungo *C. cacaofunesta* penetra na planta hospedeira através de feridas causadas por insetos e/ou por equipamentos e ferramentas durante a execução dos tratos culturais (ITON; CONWAY, 1961; SANTOS et al., 2013a). São relatadas também a participação de enzimas como as hidrolases glicosídicas, pectina liase, ligninase e a celobiose dehidrogenase, as quais podem ter importantes papéis na degradação de parede celular, favorecendo a entrada desse fitopatógeno em tecidos de *T. cacao* (MOLANO et al., 2018).

3.3.5. Estabelecimento da infecção

Após penetrar no tecido da planta, patógenos virulentos podem estabelecer contato com células hospedeiras suscetíveis, ocasionando uma relação de compatibilidade que desencadeia os sintomas da doença (AGRIOS, 2005; FLOR, 1971; JONES; DANGL, 2006). O estabelecimento da infecção ocorre em alguns casos pela ausência de respostas de defesa da planta ou quando esta é ativada de maneira fraca e/ou lenta, porém a grande maioria se inicia a partir da suplantação dos mecanismos de defesa do hospedeiro por meio da atividade de moléculas efetoras secretadas pelo patógeno (BENT; MACKEY, 2007; BOLLER; FELIX, 2009; JONES; DANGL, 2006).

Efetores, sejam eles proteínas efetoras propriamente ditas ou toxinas, são moléculas derivadas de patógenos que ao interagir com o hospedeiro podem alterar a estrutura e função das células hospedeiras, não estando envolvidas nos processos de

crescimento e desenvolvimento do fitopatógeno quando estas encontram-se externamente ao hospedeiro (BENT; MACKEY, 2007; WIN et al., 2012). A diversidade de moléculas dos fungos patogênicos depende tanto do seu modo de vida quanto da especificidade do hospedeiro, podendo estas estarem aderidas na parede celular do fungo, situadas no apoplasto ou serem transferidas para o interior das células vegetais, onde podem atuar em vários compartimentos (LO PRESTI et al., 2015).

Os efetores de fungos necrotróficos induzem a morte celular nas plantas, podendo ser antes ou durante a colonização, utilizando desta posteriormente para obtenção de nutrientes. Em *C. cacaofunesta*, via análise de dados de secretoma foram preditas 342 proteínas como potenciais efetores, sendo que destas, 86 foram validadas por meio de espectrometria de massa. Encontrou-se proteínas relatadas como: PI-PLCs, as quais podem atuar na degradação de membranas e na hidrólise de proteínas ancoradas por GPI; proteínas indutoras de necrose (NPP1s); cerato-plataninas; hidrolases glicosídicas; prováveis proteínas elicitoras de respostas em plantas; proteínas possivelmente envolvidas nas respostas vegetais ao estresse oxidativo e proteases (MOLANO et al., 2018).

3.3.6. Colonização

Os efetores são importantes fatores de virulência que influenciam diretamente na colonização do fitopatógeno no hospedeiro. Iniciando-se seu crescimento e desenvolvimento a partir o ponto de inoculação, os patógenos são capazes de induzir lesões e necroses, podendo este evento aumentar sua intensidade e espalhar-se internamente nos tecidos vegetais até que a infecção seja parada ou que a planta esteja completamente morta (AGRIOS, 2005; MOLANO et al., 2018).

Os fungos causadores de murchas geralmente produzem e espalham seus esporos no interior dos vasos, sendo estes transportados internamente via fluxo de seiva, podendo germinar e produzir micélios que invadem novos vasos. Estes esporos produzidos não são liberados para fora do hospedeiro até este morrer e desintegrar-se (AGRIOS, 2005).

Tratando-se especificamente de *C. cacaofunesta*, em genótipos suscetíveis é observada uma alta colonização com formação de muitos grupos de peritécios e liberação de ascósporos aos quatro dias após a inoculação. Por meio de estudos histopatológicos, a colonização por *C. cacaofunesta* nesses hospedeiros inicia-se a partir do sétimo dia após a inoculação, porém sendo observada a formação de poucas hifas ou

conídios. Concomitantemente, iniciam-se os sintomas de murcha nos grandes vasos xilemáticos, propagando-se lateralmente para os vasos adjacentes menores. Sendo possível notar projeções de hifas saindo através dos vasos xilemáticos (SANTOS et al., 2013a).

3.4. Prejuízos causados por *C. cacaofunesta*

Em condições ambientais favoráveis, espécies do gênero *Ceratocystis* podem causar prejuízos em diversas culturas, destacando-se: *Acacia* sp (TARIGAN et al, 2011); *Cajanus cajan* (ALARCON, 1994); *Citrus* sp (VAN WYK et al., 2010); *Coffea arabica* (VAN WYK et al., 2010); *Crotolaria* sp (ALARCON, 1994); *Eucalyptus grandis* (ROUX et al., 2004); *Ficus carica* (KAJITANI; MASUYA, 2011); *Hevea brasilienses* (VALDETARO et al., 2015); *Ipomea batatas* (ENGELBRECHT; HARRINGTON, 2005); *Lactuca sativa* (HALFRED-VIEIRA; NECHET, 2006); *Manihot esculenta* (RICKARD, 1983); *Mangifera indica* (OLIVEIRA et al., 2015); *Passiflora edulis* (FIRMINO et al., 2013); *Tectona grandis* (FIRMINO et al., 2012); *Theobroma cacao* (BEZERRA et al., 1998; SILVA et al., 2013); *Theobroma grandiflorum* (OLIVEIRA et al., 2013).

A espécie *C. cacaofunesta* historicamente vem apresentando importância a nível nacional e internacional. No Equador, durante a década de 1950 foi relatada a perda de 65.000 árvores devido a essa doença, sendo que destas 35.000 eram pertencentes ao clone ICS-1 (ALARCON, 1994; DELGADO; SUÁREZ, 2003; DESROSIERS, 1957). Na Venezuela, em 1956, estimou-se que ocorreu uma morte de 20% dos cacauzeiros existentes no país, o que representou a destruição de 120.000 plantas (DOMINGUEZ; VELÁSQUEZ, 1972; MALAGUTI, 1956). Na Costa Rica, entre 1969 e 1971, houve uma redução de 57 a 73% nos pomares de cacau devido ao acometimento por essa doença, sendo estimada uma perda anual de plantas de 5% (GUERRERO, 1975). Também já foram relatados prejuízos na Colômbia, Trinidad, México, Porto Rico, Guiana, Peru, República Dominicana e Guatemala (BAKER; HARRINGTON, 2003; GIRALDO, 1957; ITON, 1960).

No Brasil, a situação foi e tem sido ainda mais preocupante. Em 1989, o país foi acometido pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (PEREIRA et al., 1989), que causou uma das crises mais drásticas na cacauicultura no país, levando produtores à falência (FRANCISCO, 1997). Uma das estratégias desenvolvida pela CEPLAC para contenção dessa doença foi a distribuição aos produtores locais da variedade ‘Theobahia’

(MONTEIRO et al., 1995; SOUZA; DIAS, 2001), a qual apresentava resistência a *M. pernicioso*, porém suscetibilidade a outros fungos, dentre eles *C. cacaofunesta* (SILVA; LUZ, 2000). Ao encontrar essas condições favoráveis à patogenicidade, foi relatada as primeiras ocorrências da murcha-de-Ceratocystis na Bahia em 1997/98 (BEZERRA 1997; BEZERRA et al., 1998) que em pouco tempo afetou cerca de 24% do total das fazendas, distribuindo-se por 22 municípios da região e provocando a morte de milhões de árvores (DAND, 2011; OLIVEIRA et al., 2005; SILVA; LUZ, 2000).

3.5. Respostas de defesa da planta

Apesar da grande diversidade de estratégias que os patógenos utilizam para infectar seus hospedeiros, nota-se na natureza que as doenças são exceções, enquanto a resistência é uma regra, e isso acontece graças ao eficiente mecanismo de defesa das plantas, subdivido em estruturais e bioquímicos, sendo estes pré e/ou pós-formados (JONES; DANGL, 2006; STARGANLIN et al., 2011). Mecanismos estruturais (cutícula, tricomas, halos, papilas, etc.) são barreiras físicas, geralmente presentes na superfície do hospedeiro, que evitam ou atrasam a penetração e posterior colonização pelo patógeno, enquanto que os bioquímicos (fenóis, quitinases, fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese, etc.) abrangem moléculas que podem inibir ou retardar o desenvolvimento do fitopatógeno no tecido vegetal. Quando estes, tanto os estruturais quanto os bioquímicos, estão presentes antes do prévio contato com o patógeno designa-se mecanismos pré-formados, já quando são gerados após o reconhecimento do agente invasor são denominados mecanismos pós-formados (PASCHOLATI; LEITE, 1994; STARGANLIN et al., 2011).

Durante muito tempo se acreditava que esse reconhecimento e posterior desencadeamento das respostas de resistência seguiam apenas os preceitos do modelo gene-a-gene, onde é proposto que para cada gene de avirulência (Avr) do patógeno existe um gene de resistência (R) correspondente no hospedeiro (FLOR, 1971). No entanto, mais recentemente tem sido proposto que esse reconhecimento é bem mais complexo. Os patógenos têm a capacidade de secretar uma diversidade de efetores, enquanto as plantas apresentam um repertório amplo, dinâmico e diversificado de receptores, envolvendo assim elevada complexidade de interação entre ambos (DANGL et al., 2013; JONES; DANGL, 2006; WU et al., 2018). Inicialmente, receptores do sistema imune vegetal podem reconhecer efetores direta ou indiretamente. Em segundo passo, pode ser necessário a ligação com co-receptores, que são capazes de traduzir esse

reconhecimento em respostas de defesas. E finalmente, esses complexos receptores são capazes de associar-se com outros componentes de sinalização, desencadeando assim distintas respostas de resistência (WU et al., 2018).

O sistema imune vegetal pode ser dividido em duas camadas (Figura 2), a primeira é a imunidade desencadeada por PAMPs (Padrões Moleculares Associados à Patógenos), comumente chamada de PTI, enquanto que a segunda é a imunidade desencadeada por efetores, também denominada de ETI (JONES; DANGL, 2006). São consideradas respostas complementares, podendo não se diferenciar quanto ao uso da maquinaria de sinalização, mas sim o modo como ela é utilizada, sendo que a velocidade no reconhecimento poderá influenciar qual será mais efetiva, havendo diferenças na intensidade e/ou no tempo de ativação das respostas de defesa entre PTI e ETI (KATAGIRI; TSUDA, 2010).

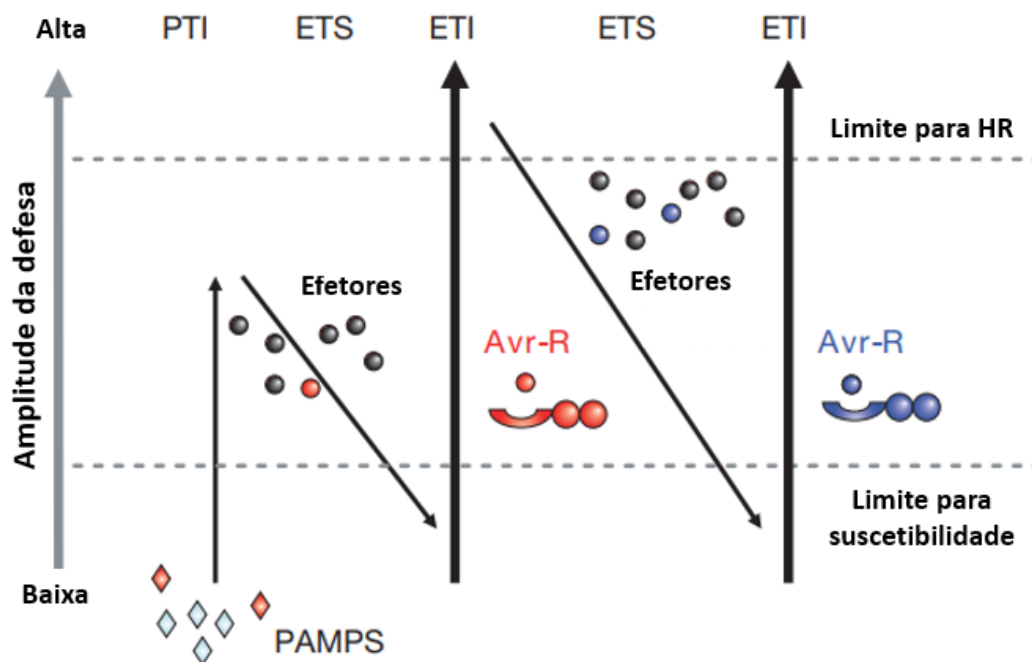


Figura 2. Modelo Zig-Zag do sistema imune vegetal, demonstrando a ativação das respostas de Imunidade Desencadeada por PAMPs (PTI), Suscetibilidade Desencadeada por Efetores (ETS) e Imunidade Desencadeada por Efetores (ETI) (JONES; DANGL, 2006).

3.5.1. Imunidade desencadeada por PAMPs (PTI)

A primeira linha de defesa é baseada na percepção dos PAMPs por Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) localizados na superfície da membrana plasmática (JONES; DANGL, 2006; SAIJO et al., 2018). Os PAMPs caracterizam-se como altamente conservados, são fundamentais para sobrevivência e adaptação do patógeno e são elicitores gerais ou inespecíficos, dificilmente excluídos, mas que podem

ser submetidos a pressão seletiva para evitar seu reconhecimento (MONAGHAN; ZIPFEL, 2012).

Os receptores responsáveis por reconhecer os PAMPs, são proteínas transmembranas classificadas como RLKs (Quinases *Receptor-Like*) ou RLPs (Proteínas *Receptor-Like*), as quais apresentam Repetições Ricas em Leucina (LRRs) e Motivos de Lisina (LysM) (MONAGHAN; ZIPFEL, 2012; WU et al., 2018). As RLKs contêm um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio de quinase intracelular que ativa a cascata de sinalização. Já as RLPs apresentam os domínios extracelular e transmembrana, porém não apresentando o intracelular de quinase (MONAGHAN; ZIPFEL, 2012).

A percepção dos PAMPs por PRRs ativa uma cascata de sinalização citoplasmática, desencadeando em aumento nos níveis de cálcio e espécies reativas em oxigênio, ativação de cascatas de MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) e reprogramação transcricional (MONAGHAN; ZIPFEL, 2012; NICAISE et al., 2009). No entanto, o atraso na ativação dessa primeira camada de defesa oferece oportunidades para que patógenos adaptados tenham a capacidade de facilmente suprimi-la, mesmo em baixa concentração de efetores, fazendo-se então necessário que para que ocorra uma nova resposta de resistência uma segunda camada de defesa precisa ser ativada, a ETI (KATAGIRI; TSUDA, 2010).

3.5.2. Imunidade desencadeada por efetores (ETI)

Na segunda camada de defesa, moléculas efetoras secretadas por patógenos são reconhecidas por genes específicos de resistência a doenças (genes R), podendo localizar-se tanto na superfície da membrana plasmática quanto no interior da célula vegetal (GOHRE; ROBATZEK, 2008; JONES; DANGL, 2006; WU et al., 2018). Os fitopatógenos têm a aptidão de liberar moléculas efetoras no apoplasto ou no citoplasma da célula, tendo ambas a capacidade de provocar uma resposta de suscetibilidade no hospedeiro, e caracterizando-se por apresentarem em sua estrutura um peptídeo sinal na posição N-terminal e um domínio responsável por suas respectivas funções na parte C-terminal, sendo que especificamente os efetores citoplasmáticos apresentam ainda um motivo N-terminal, RxLR por exemplo, que é responsável por sua translocação para o interior celular (ANDERSON, et al., 2015; GOHRE; ROBATZEK, 2008; WIN et al., 2012).

A percepção desses efetores na superfície da célula ocorre de forma análoga a PTI, com a participação das RLKs e RLPs, já intracelularmente o reconhecimento processa-se por meio de uma classe de proteínas imunoreceptoras, as NB-LRR, as quais possuem outros domínios variáveis, podendo assim perceber e interagir com todos os tipos de moléculas oriundas de fitopatógenos, desde PAMPs até evoluídos e complexos efetores (LEE; YEOM, 2015; WIN, et al., 2012). Esse reconhecimento e posterior ativação da cascata de sinalização pode seguir três modelos: o gene-a-gene, onde ocorre diretamente a interação de um efector (Avr) com um gene R da planta (FLOR, 1971); o modelo guarda, em que o efector é reconhecido de forma indireta, sendo mediado por co-receptores, também chamadas de “células guardas”, que são alvos dos alvos dos efetores e que podem interagir com os genes R, transmitindo para estes a sinalização proveniente da perturbação patogênica (JONES; DANGL, 2006) e o modelo *decoy*, sendo considerado como uma modificação do anterior, neste as plantas produzem proteínas falsas que são semelhantes aos alvos dos efetores, essas proteínas ligam-se às moléculas efectoras e mediam a interação destas com os genes R (VAN DER HOORN et al., 2008).

As respostas desencadeadas pela ETI são mais aceleradas e potencializadas quando comparadas as proporcionadas pela PTI, podendo ocorrer fracamente, sem manifestação de sintomas macroscópicos; ou fortemente, com exteriorização da Resposta de Hipersensibilidade (HR) (GOHRE; ROBATZEK, 2008). A HR é uma morte celular programada (PCD) desencadeada pela planta como uma maneira de conter a infecção fitopatogênica, principalmente contra patógenos biotróficos (MOREL; DANGL, 1997; SALGUERO-LINARES; COLL, 2019). Os eventos mais comuns desencadeados pela HR são o encolhimento do citoplasma, condensação da cromatina, inchaço mitocondrial, vacuolização e ruptura dos cloroplastos (COLL et al., 2011). Os sinais de respostas advindos da HR podem ser amplificados, principalmente pela ação dos hormônios SA, JA e etileno, que desencadeiam a ativação de fatores de transcrição de genes de defesa e emissão de sinais para células adjacentes, podendo proporcionar consequentemente à planta uma Resistência Sistêmica Adquirida (RAS), prevenindo-as assim de futuras infecções provenientes do mesmo agente fitopatogênico (ÁDÁM et al., 2018).

3.6. Seleção de genes de defesa do *T. cacao* ao *C. cacaofunesta*

Como mencionado anteriormente, a resistência às doenças nem sempre segue o modelo proposto por Flor (1971), sendo então necessário para desencadear respostas de

defesa não apenas um gene, mas sim um conjunto destes, designando então na chamada resistência quantitativa, que se caracteriza por manifestar fenotipicamente distintos níveis, distribuindo-se de forma contínua (AGRIOS, 2005; MATHER; JINKS, 1984). Na interação entre *T. cacao* e *C. cacaofunesta*, genótipos foram classificados em grupos de acordo com seu nível de resistência, sendo resistentes: SIAL 577, CB 205, CBI 205, CEPEC 2002 (VB1151), TSH 1188, PS 13.19, CEPEC 2007 (VB681) e Jaca; intermediários: SIC 644, SIC 812, TSAN 792, PH 15, CP 44, CP 46 e ICS 1; suscetíveis: Catongo, CCN 10, CA 1.4, SJ 02, CCN 51 e PH 16 (OLIVEIRA et al., 2009; SILVA et al., 2004).

Sendo considerada então a resistência do cacaueiro a murcha-de-Ceratocystis como quantitativa, algumas estratégias são adotadas para identificar genes candidatos envolvidos nessa interação, tais como a identificação QTLs (*Quantitative Trait Loci*) (FERNANDES et al., 2018; LANAUD et al., 2009; SANTOS et al., 2012a) e a produção e análise de dados de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) (ARGOUT et al., 2008; SANTOS et al., 2013b). Sendo facilitado o desenvolvimento destes trabalhos após o sequenciamento e anotação do genoma do *T. cacao* (ARGOUT et al., 2011; MOTAMAYOR et al., 2013).

Para construção das bibliotecas de ESTs foram inoculadas hastes de plantas de cacaueiro do genótipo Jaca, que são considerados resistente à murcha-de-Ceratocystis (SILVA et al., 2004). Na biblioteca proveniente dos tecidos inoculados foram identificados 1729 ESTs, enquanto que na SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*) infectada identificou-se 1364 ESTs e na SSH não infectada encontrou-se 339 ESTs (ARGOUT et al., 2008), sendo que nestes foram detectados 428 ESTs-SSRs, dentre os quais 4% estão possivelmente relacionados com resposta de defesa (SANTOS et al., 2013b). Em outros trabalhos, foram identificados QTLs ligados com a resistência a este patógeno, os quais encontraram-se no grupo de ligação 3 e no grupo de ligação 9 (SANTOS et al., 2012a). Posteriormente, em busca e anotação dos genes compreendidos nesses grupos de ligação, foram constatados 36 genes candidatos para resistência à murcha-de-Ceratocystis (SANTOS, 2012).

Analizando conjuntamente os resultados provenientes dos trabalhos supracitados (ARGOUT et al., 2008; SANTOS et al., 2012a; SANTOS, 2012; SANTOS et al., 2013b), fazendo busca de genes para resistência via *script* de bioinformática (SILVA; MICHELI, 2020) e mediante revisão em literaturas (PEREIRA et al., 2020; ZHAO et al., 2012), destacaram-se como fortes candidatos duas proteínas RLKs: a *Probable LRR*

receptor-like serine/threonine-protein kinase (LRR-STK), a *Putative Cysteine-rich receptor-like protein kinase 10 (CRK10)*; a provável *Disease Resistance Response protein 206 (DRR206)*; o *Bax-inhibitor-1 (BI-1)*; uma provável *LRR protein intracelular (NB-LRR)*, a *thaumatin-like protein (PR5)* e o *Ethylene-responsive transcription factor RAP2 (RAP2)* (Figura 3).

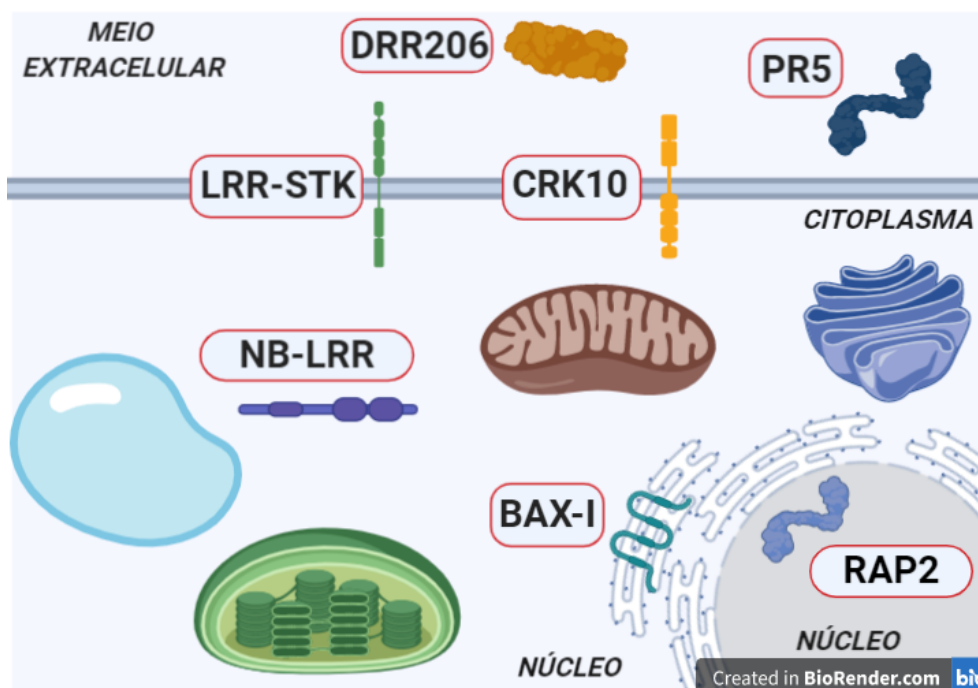


Figura 3. Proteínas dos respectivos genes selecionados via minerações em biblioteca de ESTs, dados de QTLs e revisão em literatura. Sendo: *Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase (LRR-STK)*, *Putative Cysteine-rich receptor-like protein kinase 25 (CRK10)*; *Disease Resistance Response protein 206 (DRR206)*; *Bax-inhibitor-1 (BI-1)*; *LRR-protein intracelular (NB-LRR)*; *thaumatin-like protein (PR5)* e *Ethylene-responsive transcription factor RAP2 (RAP2)*.

3.6.1. RECEPTOR-LIKE KINASES (RLKs)

A percepção de sinais provenientes de agentes externos pode acontecer já na superfície da membrana plasmática, na maioria das vezes via *receptor-like kinases (RLKs)*. Esses receptores são compostos por um ectodomínio variável, responsável pelo reconhecimento do sinal elicitador; um domínio transmembrana e um domínio quinase citoplasmático (SHIU; BLEECKER, 2001; WALKER, 1994; YANG et al., 2012). Receptores RLKs são responsáveis pela transmissão de sinais externos para o interior da célula (WOLF, 2017). Extracelularmente, são perceptíveis moléculas de várias naturezas, tais como proteínas, RNAs, fitohormônios, espécies reativas de oxigênio, açúcares, nucleotídeos, polissacarídeos e íons (LIANG; ZHOU, 2018). Intracelularmente, a transdução desses sinais inicia-se via domínio quinase, o qual

interage com outras quinases reguladoras, proteínas inibitórias ou com fatores ou componentes acessórios que são fosforilados após essa interação, desencadeando na ativação e início da cascata de sinalização (WOLF, 2017; YANG et al., 2012).

RLKs têm efetiva participação em muitos processos, estando inclusive regulação do desenvolvimento, reconhecimento de potenciais invasores e principalmente resistência a doenças (SHIU; BLEECKER, 2001). Esses receptores são subdivididos em subfamílias de acordo com seu domínio, destacando-se nestas as pertencentes à *LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase* (LRR-STKs) (AFZAL et al., 2008; STONE et al., 1994), e à *cysteine-rich receptor-like protein kinases* (CRKs) (CHEN, 2001), que exercem papel fundamental na imunidade vegetal, participando no reconhecimento de PAMPs e/ou efetores fitopatogênicos (LIU et al., 2017; SHIU; BLEECKER, 2001).

LRR-STKs após percepção de sinais elicitores externos, iniciam no citoplasma celular a fosforilação de resíduos de serina e treonina, o que implica na ativação das cascatas de sinalização de MAPKs, desencadeando com isso respostas de defesas como a ativação de fatores de transcrição, geração de óxido nítrico e superóxido, produção de compostos antimicrobianos, podendo inclusive resultar na HR ou PCD (AFZAL et al., 2008; BECRAFT, 2002; LIN et al., 2014). Exemplos de LRR-STKs são o FLS2 (*Flagellin Sensitive 2*) (GÓMEZ; GÓMEZ; BOLER, 2000) e o SR160 (*Systemin Cell-surface Receptor*) (SCHEER; RYAN, 2002). Já as CRKs, consideradas como uma das superfamílias das RLKs (CHEN, 2001), estão possivelmente envolvidas na sinalização de EROs e sofrem aumento no nível transcricional quando submetidas a estresse oxidativo, a ataques fitopatogênicos ou ao ácido salicílico, estando envolvidas nas respostas a estresses bióticos e abióticos, bem como na resistência a doenças com um possível desencadeamento de uma PCD (CHEN et al., 2004; CZERNIC et al., 1999; EDERLI et al., 2011; IDANHEIMO et al., 2014; QI et al., 2017). Exemplos de CRKs são CRK13 (ACHARYA et al., 2007), CRK20 (EDERLI et al., 2011), CRK6 e CRK7 (IDANHEIMO et al., 2014).

3.6.2. DISEASE RESISTENCE RESPONSE PROTEIN 206 (DRR206)

Mediante reconhecimento dos PAMPs e/ou efetores fitopatogênicos, a proteína DRR206 pode ser ativada, a qual está supostamente implicada com a síntese de mecanismos estruturais e/ou bioquímicos, ocasionando assim na resistência de não-hospedeiro, também chamada de basal, em plantas (CHOI et al., 2004; CULLEY et al.,

1995). Apesar de complexa e não totalmente compreendida, esse é um tipo de resistência comum nas plantas vasculares, que se caracteriza principalmente pela concomitante ativação de um grande número de genes e pela síntese e acumulação de fitoalexinas, podendo ainda está relacionada com ativação transcricional de outras proteínas relacionadas à patogênese (PRs) ou outros genes que codificam a Fenilalanina Amônia-Liase (PAL), Chalcone Sintase (CHS), quitinases, β -glucanases e defensinas, protegendo assim a planta contra a invasão de uma grande diversidade de fitopatógenos (HADWIGER, 2008; WANG; FRISTENSKY, 2001).

Em trabalhos anteriores foi demonstrado que a *DRR206* manifesta uma resposta precoce após a exposição contra agentes fitopatogênicos, sendo relatado que em genótipos de *Pisum sativum* inoculados com *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, houve um aumento significativo do isoflavonóide pisatina, sua mais importante fitoalexina, e do piroesinol, pertencente à classe das ligninas, os quais são sintetizados e acumulados nas células epidérmicas do endocarpo, estando assim envolvidos diretamente com o incremento da resposta de resistência contra a invasão de patógenos (SENEVIRATNE et al., 2015). Embora pouco estudada, a *DRR206* já foi demonstrada como responsiva pela resposta de resistência de plantas a patógenos, tais como *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* (WANG; FRISTENSKY, 2001); *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* e *Alternaria alternata* (CHOI et al., 2004); e *F. solani* f sp *phaseoli* (SENEVIRATNE et al., 2015).

3.6.3. *BAX-INHIBITOR-1 (BI-1)*

Após submetidas a estresses bióticos e/ou abióticos, especialmente mediante ao ataque de patógenos necrotróficos, as plantas podem expressar em vários tecidos o *BAX-Inhibitor-1 (BI-1)* (SCOTTON et al., 2017; WATANABE; LAM, 2006). *BI-1* são pequenas proteínas altamente conservadas, em animais e plantas, que se localiza predominantemente na membrana do retículo endoplasmático, estando envolvidas na regulação negativa da proteína *BAX*, e consequentemente na PCD (LAM, 2009; WATANABE; XU et al., 2017; XU; REED, 1998).

A PCD em plantas ocorre em várias etapas do seu desenvolvimento, mas principalmente quando estas são submetidas a ataques fitopatogênicos, sendo altamente efetiva para conter desenvolvimento de patógenos biotróficos, através do desencadeamento da HR, porém favorece o estabelecimento e colonização de patógenos necrotróficos em seus tecidos, os quais precisam das células mortas para completar seu

desenvolvimento (GOVRIN; LEVINE, 2000). PCD pode ser regulada positivamente por vários fatores, destacando-se entre estes a proteína *BAX*, a qual atua na formação poros na mitocôndria, interferindo assim na sua função (DANIAL; KORMEYERS, 2004; KAWAI-YAMADA, et al., 2004).

A localização do *BAX* na mitocôndria resulta na liberação do citocromo *c*, seguindo com a ativação de proteínas caspases baseadas em cisteína, as quais subsequentemente clivam proteínas necessárias para a sobrevivência celular (ISHIKAWA et al., 2011). Em contrapartida, O *BAX-inhibitor* tem sua atuação baseada na inibição da ativação do *BAX* e no bloqueio da sua translocação até a mitocôndria, suprimindo assim a ativação das proteínas tipo caspases, podendo ainda aumentar a homeostase celular sob condições de estresse oxidativo (ISHIKAWA et al., 2011; LI et al., 2014). Já foi descrito que a superexpressão do *BAX-inhibitor* pode limitar a colonização por patógenos necrotróficos e hemibiotróficos, como *Magnaporthe grisea* (MATSUMURA et al., 2003), *Fusarium graminearum* (BABAEIZAD et al., 2009), *S. sclerotium*, *Sclerotium rolsii*, *Botrytis cinerea* e *Moniliophthora perniciosa* (SCOTTON et al., 2017).

3.6.4. LRR PROTEIN INTRACELULAR (NB-LRR)

Além do reconhecimento extracelular de PAMPs mediados por PRRs, as plantas conseguem identificar intracelularmente moléculas efetoras secretas por patógenos por meio de proteínas pertencente à classe das NB-LRRs (JONES; DANGL, 2006). Essas proteínas possuem um domínio LRR (*leucine-rich repeat*) na extremidade C-terminal, um domínio NB na parte central e um domínio variável na extremidade N-terminal, podendo estarem localizadas no núcleo, citoplasma ou até em cloroplastos (CAPLAN et al., 2008; NAIR; ROST, 2005; SHAO et al., 2016). Destaca-se o domínio LRR, o qual é altamente polimórfico e variável em números de repetições, estando geralmente implicado com a especificidade do reconhecimento e podendo ainda participar em interações com outras moléculas, o que implica na formação de variados complexos de sinalização (BONARDI; DANGL, 2012).

Efetores podem ser reconhecidos de forma direta ou na maioria das vezes indiretamente, podendo em alguns casos os receptores NB-LRRs utilizarem componentes provenientes da membrana plasmática, do citoplasma, dos cloroplastos ou do núcleo durante o reconhecimento (CAPLAN, et al., 2008). Essas proteínas são responsáveis pelo rápido reconhecimento de efetores e pela ativação de cascatas de

sinalização no citoplasma que pode desencadear em distintas respostas de defesa, incluindo intensificação do estresse oxidativo, influxo de cálcio e de íons, ativação de cascatas de MAPKs, indução de PRs e em alguns patossistemas resultando na indução da HR (BELKHADIR et al., 2004; CHISHOLM et al., 2006; DANGL; JONES, 2001; LEE; YEOM, 2015). Desta forma as NB-LRRs podem estar envolvidas na sinalização após percepção de diferentes patógenos, atuando ainda em outras vias metabólicas relacionadas principalmente com a tolerância a seca e o desenvolvimento de fitohormônios, podendo estes estarem ou não relacionados com a ativação do sistema imune vegetal (TAMELING; JOOSTEN, 2007).

3.6.5. *PR5-THAUMATIN LIKE PROTEIN (PR5)*

Após reconhecimento e posterior ativação da cascata de sinalização, podem ser desencadeadas respostas de defesas tardias, principalmente mediadas por proteínas relacionadas à patogênese (PRs), que de acordo com sua composição de aminoácidos, estrutura e função bioquímica, são divididas em 17 famílias que apresentam grande diversidade de propriedades antimicrobianas (FISTER et al., 2016; SELS et al., 2008). Dentre estas está a família PR5, denominada também como *thaumatin-like proteins* (TLPs), as quais possuem cerca de 200 aminoácidos que compartilham semelhança com a sequência da taumatina, uma proteína de sabor doce encontrada nos frutos da floresta tropical da África Ocidental (VELAZHAHAN et al., 1998).

As TLPs possuem uma massa molecular de aproximadamente 22 kDa, sendo sua estrutura considerada bastante estável, o que a torna resistente às degradações por proteases (SELITRENNIKOFF, 2001). Essas proteínas geralmente sofrem aumento em nível de expressão em resposta a estresses bióticos e/ou abióticos, destacando-se principalmente sob condições de infecção por fitopatógenos e exposição a seus efetores (PETRE et al., 2011). São consideradas sobretudo como antifúngicas, sendo capazes de ocasionar mudanças na integridade ou até degradação da parede celular destes patógenos, o que pode levar a inibição do seu crescimento e provocar diminuição no número e na viabilidade de germinação de seus esporos (ABAD et al., 1996; TOBIAS et al., 2007).

3.6.6. *ETHYLENE-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR RAP2 (RAP2)*

Outro grupo de genes que desempenham um papel fundamental na dinâmica de expressão gênica e consequentemente na modulação das respostas desencadeadas pelo

sistema imune vegetal são os fatores de transcrição (FTs). Esses FTs são proteínas que desempenham funções regulatórias, tanto para ativar quanto para reprimir a transcrição de determinados genes alvos. Isso acontece mediante reconhecimento de sequências curtas e específicas de DNA presentes em regiões regulatórias (FRANCO-ZORRILLA; SOLANO, 2017; TSUDA; SOMSSICH, 2015). As modificações transacionais induzidas por FTs podem implicar, direta ou indiretamente, na ativação de complexos de PRRs e cascatas de MAPKs; na sinalização mediada por Ca^{2+} ; produção de espécies reativas de oxigênio; síntese de hormônios vegetais, como etileno e ácido salicílico; síntese de mecanismos pós-formados, como deposição de calose e produção de fitoalexinas (LI et al., 2016).

Dentre os FTs possivelmente responsivos pela regulação de respostas imune, pode-se destacar a família dos *Ethylene response factors* (ERFs). O etileno é considerado essencial em muitos processos biológicos e um regulador chave de respostas a estresses bióticos e abióticos em plantas (MORGAN; DREW, 1997; MÜLLER; MUNNÉ-BOSCH, 2015), sendo sua via de sinalização em *A. thaliana* já bem estabelecida (MÜLLER; MUNNÉ-BOSCH, 2015; STEPANOVA; ALONSO, 2009; WANG; LI; ECKER, 2002; YOO; CHO; SHEEN, 2009). O *RAP2* é um membro da família ERFs e já foi descrito como desencadeador de respostas de resistência contra fitopatógenos, destacando-se em *A. thaliana* contra o fungo *Botrytis cinerea* (ZHAO et al., 2012) e em *Citrus reticulata* contra a bactéria *Xylella fastidiosa* (PEREIRA et al., 2020), ambos patógenos necrotróficos. *RAP2* já foi descrito como importante para sobrevivência a hipóxia (HINZ et al., 2010), participando em respostas a ácido abscísico, estresse salino e osmótico (ZHU et al., 2010), assim como induzindo a deposição de calose (ALI et al., 2013).

3.7. Expressão gênica

Para estudo das interações entre *T. cacao* e diversos patógenos têm sido utilizadas variadas técnicas moleculares, dentre elas a análise de dados oriundos de transcriptoma (ALI et al., 2017; AMBROSIO et al., 2013; DA HORA JUNIOR et al., 2012; FISTER et al., 2015; GESTEIRA et al., 2007; LITHOLDO et al., 2015; POKOU et al., 2019; RINCONCES et al., 2008). Geralmente, trabalhos envolvendo dados transcriptômicos visam identificar a expressão diferencial de genes candidatos, e para essas análises uma das técnicas mais utilizadas tem sido o *Real-time PCR* (RT-qPCR), apresentando como principais vantagens a rapidez, alta sensibilidade, especificidade,

reprodutibilidade e ampla faixa de quantificação (BUSTIN, 2000; GACHON et al., 2004; MIRMAJLESSI et al., 2015).

Dando continuidade nessa linha pesquisa, mais especificamente envolvendo a interação entre *T. cacao* – *C. cacaofunesta*, foram selecionados para análise de expressão gênica via RT-qPCR quantitativo duas RLKs, uma provável *DRR206*, o *BI-1*, uma provável *NB-LRR* e o *RAP2*, estando estes potencialmente envolvidos em distintas etapas de reconhecimento do fitopatógeno e/ou em cascatas de sinalização.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção de genes

Para seleção dos genes a serem estudados, foram feitas filtragem de dados de QTLs e mineração em bibliotecas de ESTs. Primeiramente, a busca por genes candidatos mediante análise de QTLs foi feita tendo como base os trabalhos de Santos et al. (2012a e 2012b), onde resultaram no estabelecimento de uma lista de 36 genes candidatos. Dessa lista, para realização do atual trabalho foram selecionados, mediante análises de funções putativas e revisão de literatura, a *PR5*, o *BI-1* e a *DDR206*, como fortes candidatos a resistência à murcha-de-Ceratocystis (Figura 4).

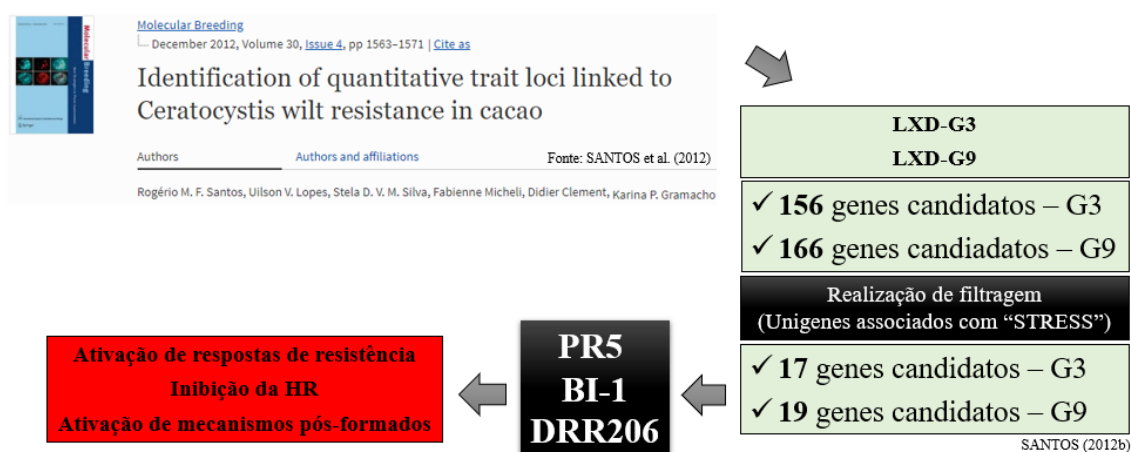


Figura 4. Metodologia para seleção dos genes *PR5*, o *BI-1* e a *DDR206* através da mineração em biblioteca de ESTs.

Em segunda parte, foi feita uma busca em bibliotecas de ESTs utilizando como referência o trabalho de Argout et al. (2008). Tendo como principal alvo a biblioteca SSH (*Suppressive and Subtractive Hybridization*) infectada, foi realizada uma mineração utilizando a ferramenta RRG_predictor (SILVA; MICHELI, 2020), a qual visa identificar Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) e/ou Genes *R* por meio da análise dos seus domínios conservados. Partindo disso, foram identificados sete ESTs, dos quais foram selecionados três possíveis candidatos a receptores, as *CRK10*, *LRR-STK* e *NB-LRR*, que mediante revisão de literatura, podem estar direta ou indiretamente implicadas com o reconhecimento inicial de PAMPs e/ou efetores (Figura 5).

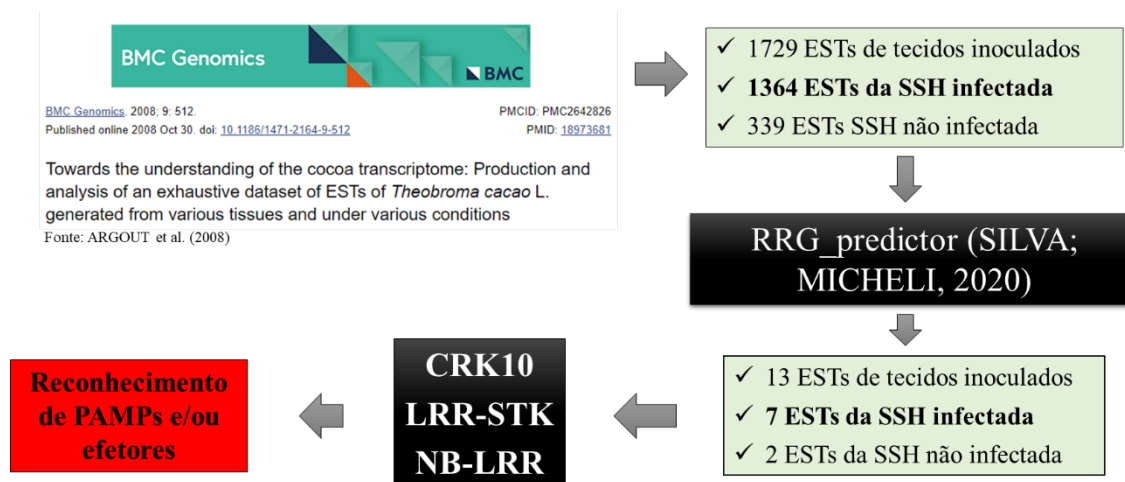


Figura 5. Metodologia para seleção dos genes *CRK10*, *LRR-STK* e *NB-LRR* através da mineração em dados de QTLs.

4.2. Análises *in silico*

Para as análises *in silico*, primeiramente foram baixadas, na segunda versão do genoma do cacau (ARGOUT et al., 2011), as sequências dos sete genes selecionados e suas respectivas proteínas. Posteriormente, para estabelecimento das estruturas dos genes utilizou-se a ferramenta GSDS 2.0 (HU et al., 2015), tendo como dados de entrada os arquivos GFF gerados no *GenomeBrowser* para cada gene. Para as proteínas, foram preditos os tamanhos, domínios, peptídeo sinal, peso molecular e ponto isoelétrico, sítios de acetilação, glicosilação e fosforilação, mediante utilização das ferramentas InterProScan (JONES et al., 2014), SignalP (ALMAGRO ARMANTEROS et al., 2019), Compute pI/Mw (GASTEIGER et al., 2005), NetAcet (KIEMER et al., 2004), NetNGlyc (GUPTA et al., 2004) e NetPhos (BLOM et al., 1999), respectivamente. Em seguida, foi estabelecida a localização de cada proteína via ferramenta DeepLoc (ALMAGRO ARMENTEROS et al., 2017).

4.3. Ontologias gênicas e obtenção de redes de interação proteína-proteína

Para seleção de ortólogos foi utilizado como referência o genoma de *Arabidopsis thaliana*, sendo a busca realizada por meio da ferramenta BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), selecionando as proteínas que apresentavam cobertura acima de 90% e identidade acima de 30%, sendo posteriormente esses valores validados mediante BlastP recíproco, utilizando como entrada as proteínas selecionadas de *A. thaliana* contra as ortólogas de *T. cacao*. Posteriormente, para estabelecer as redes de interações, as proteínas ortólogas de *A. thaliana* foram submetidas na ferramenta

STRING (SZKLARCZYK et al., 2018) utilizando os parâmetros *default*, gerando individualmente, uma rede de interação direta com outras 10 proteínas.

4.4. Desenho de *primers*

Os *primers* para expressão gênica por RT-qPCR foram desenhados seguindo os parâmetros propostos por Thornton e Basu (2011) com algumas adaptações, priorizando tamanhos de 20 até 25 nt (menores diminui a especificidade e maiores podem aumentar a ocorrência de grampos e dímeros), porcentagens de GC entre 45 a 60%, temperatura de Melting em torno de 58°C e ΔG para ocorrência de dímeros e grampos maiores que -8,5. Como ferramenta para desenho utilizou-se o Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2007). A verificação de *hairpins*, dímeros e heterodímeros foram feitas utilizando a ferramenta OligoAnalyzer (OWCZARZY et al., 2008) e a especificidade dos *primers* verificadas através do *PrimerBlaster* no genoma do cacau (ARGOUT et al., 2011).

4.5. Predição das T_m e curvas de dissociação para os *amplicons*

Para predição das T_m e curvas de dissociação para cada um dos respectivos *amplicons* foi utilizada a ferramenta uMELT (DWIGHT; PALAIS; WITTEWER, 2011). Selecionando-se em *Thermodynamic Set* o modelo *Unified-SantaLucia* (SANTALUCIA, 1998), com os parâmetros $[Mono^+] = 10\text{ mM}$, $free[Mg^{++}] = 3\text{ mM}$ e $DMSO\% = 10\%$, e *Salt Correction* seguindo o modelo de Owczarzy (OWCZARZY et al., 2008).

4.6. Checagem das famílias gênicas

Os genes estudados foram avaliados em relação à sua inclusão, ou não, em famílias gênicas. As sequências das proteínas para alinhamento foram obtidas na segunda versão do genoma do cacau (<https://cocoa-genome-hub.southgreen.fr/>), utilizando os respectivos IDs: Tc06v2_p017470.1 (*CRK10*); Tc09v2_p008300.2 (*LRR-STK*); Tc03v2_p020150 (*BI-1*); Tc09v2_p027710.1 (*DRR206*); Tc07v2_p006670.1 (*NB-LRR*); Tc03v2_p022890.1 (*PR5*) e Tc06v2_p010530.1 (*RAP2*). Para cada uma dessas proteínas foi feito um BlastP na segunda versão do genoma do cacau, para identificação de suas respectivas sequências homólogas. Posteriormente, para validação e verificação das famílias gênicas, cada grupo de proteína foi submetido no NCBI/Conserved Domain Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>), onde mediante observação dos domínios conservados, para cada arquivo de entrada, foram filtrados

somente as sequências que o continham, definindo assim as famílias gênicas em que cada uma das proteínas em estudo estão inseridas.

4.7. Alinhamento das sequências e testes *in silico* para verificar a especificidade dos *primers*

Posteriormente, foram realizados, para cada par de *primer*, sua verificação nas respectivas famílias gênicas. Para cada uma dessas famílias obteve-se as sequências gênicas de todos os seus membros. Os genes foram alinhados utilizando a ferramenta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Para visualização dos alinhamentos foi utilizada a ferramenta Mview (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mview/>), sendo posteriormente destacado os locais onde foram desenhados cada par de *primer* em seu respectivo gene selecionado. Para verificação da especificidade dos *primers*, foi utilizado ainda a ferramenta *PrimerBlaster* na segunda versão do genoma do cacau (ARGOUT et al., 2011).

4.8. Escolha do material vegetal e inoculação

Como material vegetal foram utilizados dois genótipos de *T. cacao*, CCN 51 e TSH 1188, sendo suscetível e resistente à murcha-de-Ceratocystis, respectivamente. Estes genótipos já foram anteriormente definidos e utilizados como padrões de suscetibilidade e resistência em vários estudos moleculares e histológicos envolvendo o patossistema *T. cacao* – *C. cacaofunesta* (FERNANDES et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2009; SANCHES et al., 2008; SANTOS et al., 2013a). A inoculação (Figura 6) foi realizada em mudas clonais com um ano de idade, sendo feita uma incisão com auxílio de um bisturi no galho a ser inoculado, onde em seguida foram depositados, usando-se uma pipeta automatizada, 30 µl de uma suspensão a $3,0 \times 10^4$ UFC/mL do isolado Cf20. Logo após, para formar uma “mini câmara úmida”, foi colocado um algodão umedecido abaixo da incisão, prosseguindo-se com vedação do local da inoculação com fita plástica aderente (veda-rosca), permanecendo-a até o momento da coleta. Como controle negativo, mudas foram inoculadas utilizando-se água estéril e seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente (Figura 6).

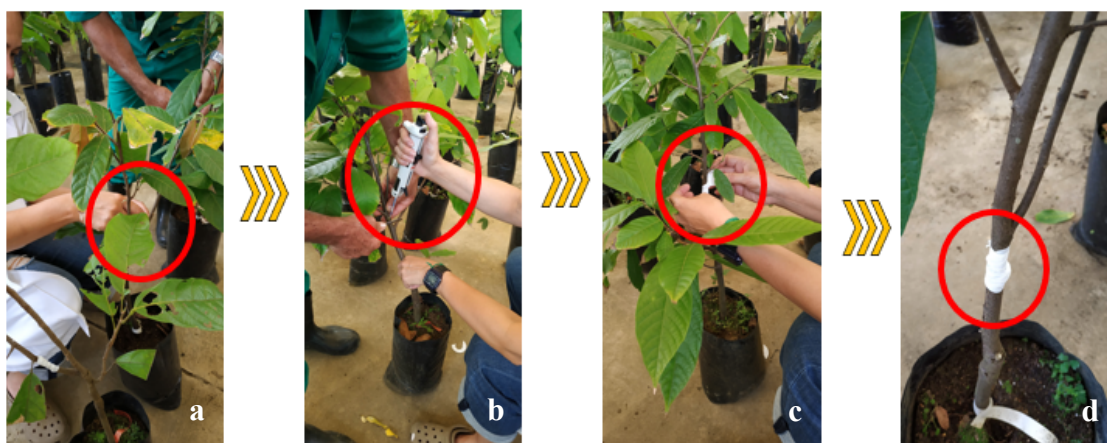


Figura 6. Procedimento de inoculação do fungo *C. cacaofunesta* nos genótipos TSH1188 e CCN 51 de *T. cacao*: a) incisão, com auxílio de bisturi, do tecido a ser inoculado; b) deposição do inóculo no local da incisão; c) inserção de algodão umedecido logo abaixo do local da inoculação; d) vedação com fita plástica aderente (veda-rosca).

4.9. Escolha dos pontos e coleta do material

Baseando-se em estudos histopatológicos feitos anteriormente (SANTOS et al., 2013a), foram selecionados seis pontos de coleta do material: 4 horas após a inoculação (hai), 24 hai, 48 hai, 72 hai, 7 dias após a inoculação (dai) e 15 dai. Foram coletados, em três plantas distintas, aproximadamente 125 mm³ de tecido onde foi feita a inoculação (Figura 7), sendo imersos em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o momento da extração do RNA.



Figura 7. Coleta do material: a) região do caule onde foram coletadas as amostras; b) amostras, de aproximadamente 125 mm³, coletadas em triplicata biológica.

4.10. Extração do RNA total

Um *pool* com a triplicata biológica de cada tratamento foi macerado em nitrogênio líquido. Posteriormente, o RNA total do macerado foi extraído utilizando o *RNAqueous® Kit*, seguindo as recomendações do fabricante (Ambion) com

modificações nos tempos das centrifugações e duplicação das etapas de lavagem, sendo o RNA total eluído em 60 µL de tampão de eluição e em seguida quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop2000 (Thermo Scientific). A integridade e pureza foram verificadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, utilizando-se 10 µl de cada RNA, 5 µl de gel red e 3 µl de tampão de carregamento.

4.11. Tratamento com DNase e síntese de cDNA

Para eliminação de possíveis contaminações com DNA genômico, efetuou-se tratamento com DNase utilizando o kit DNase I, mediante recomendação do fabricante (Invitrogen). Primeiramente, foi feito Mix inicial contendo 2,5 µl do TP 10X, 0,25 µl de DNase e 0,5 µl de Ribolock.

Os RNAs totais das amostras foram padronizados em concentrações de 250 ng, 500 ng e 1000 ng, sendo ajustado o volume final da reação (Tabela 1), 3,25 µl do Mix 1 e água estéril até completar o volume final de 25 µl. O material foi incubado a 37 °C durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 2,5 µl de EDTA [50 mM] e a reação incubada a 75 °C por 10 minutos.

Tabela 1. Concentrações, em ng/µl, das 24 amostras de RNA total e volumes, em µl, utilizados de Mix, água e RNA total nas reações de tratamento para eliminação de DNA genômico.

Tratamento	ng/µl	Volume de RNA (µl)	Concentração final real (ng)	Concentração final padronizada (ng)	Mix (µl)	Água (µl)	Volume final da reação (µl)
CCN51-NI-4hai	12,6	20,00	252	250	3,25	1,75	25
TSH1188-I-24hai	15,5	16,00	248	250	3,25	5,75	25
CCN51-I-72hai	19,4	13,00	252,2	250	3,25	8,75	25
TSH1188-I-4hai	22,3	11,00	245,3	250	3,25	10,75	25
CCN51-I-4hai	22,6	11,00	248,6	250	3,25	10,75	25
TSH1188-I-48hai	26,1	19,00	495,9	500	3,25	2,75	25
CCN51-NI-72hai	28,5	17,50	498,75	500	3,25	4,25	25
TSH1188-NI-24hai	32,8	15,50	508,4	500	3,25	6,25	25
TSH1188-NI-4hai	37	13,50	499,5	500	3,25	8,25	25
CCN51-I-24hai	37,3	13,50	503,55	500	3,25	8,25	25
CCN51-NI-24hai	43,7	11,50	502,55	500	3,25	10,25	25
TSH1188-NI-72hai	44	11,50	506	500	3,25	10,25	25
TSH1188-I-72hai	51,8	19,50	1010,1	1000	3,25	2,25	25
CCN51-NI-7dai	53	19,00	1007	1000	3,25	2,75	25
TSH1188-NI-7dai	57,1	17,50	999,25	1000	3,25	4,25	25
TSH1188-NI-48hai	58,7	17,00	997,9	1000	3,25	4,75	25
TSH1188-I-15dai	61,2	16,50	1009,8	1000	3,25	5,25	25
CCN51-NI-15dai	95,9	10,50	1006,95	1000	3,25	11,25	25
CCN51-I-48hai	103,8	9,50	986,1	1000	3,25	12,25	25
TSH1188-I-7dai	127,3	8,00	1018,4	1000	3,25	13,75	25
CCN51-NI-48hai	132,9	7,50	996,75	1000	3,25	14,25	25
CCN51-I-15dai	179,2	5,50	985,6	1000	3,25	16,25	25
TSH1188-NI-15hai	192,2	5,50	1057,1	1000	3,25	16,25	25
CCN51-I-7dai	198,6	5,00	993	1000	3,25	16,75	25

A síntese do cDNA foi feita mediante utilização do *RevertAid First Strand cDNA Syntesis Kit*, seguindo as recomendações do fabricante (Thermo Scientific). Primeiramente, utilizou-se 11 µl de cada amostra de RNA tratado e adicionou-se 1 µl do *primer* de Oligo (dt)₁₈ *primer*, misturou-se gentilmente e incubou a 65°C durante 5 min, sendo ao final colocadas no gelo. Em segundo passo, fez-se um mix contendo 4 µl de 5x *Reaction buffer*; 1 µl de *Ribolock*; 2 µl 10 mM dNTP e 1 µl da enzima *Revertaid*, multiplicando esses volumes por 27, sendo então pipetados 8 µl para cada amostra, resultando em volume final de 20 µl. Misturou-se gentilmente e em seguida incubou-se a reação a 25°C por 5 min, 45°C por 60 min, 70°C por 5 min, finalizando com o resfriamento até alcançar a temperatura de 4°C, sendo em seguida o cDNA estocado em freezer -20 °C.

Após sintetizados, para realização das reações de qPCR, as concentrações dos cDNAs foram padronizadas em 110 ng e feitas diluições 1:20 das 24 amostras, em um volume final de 200 µl.

4.12. Diluição dos *primers*

Os seis pares de *primers*, originalmente liofilizados, foram diluídos em água estéril, sendo os adicionados os respectivos volumes com a finalidade de garantir nessa primeira diluição uma solução estoque para cada *primer* com uma concentração de 100 µM. Para a solução de trabalho fez-se uma segunda diluição, adicionando 40 µl do *primer* (20 µl do *primer forward* e 20 µl do *primer reverse*) em 360 µl de água estéril, resultando em uma concentração, nessa solução de trabalho, de 10 µM/µl para cada *primer*.

4.13. Escolha dos normalizadores

Baseado no trabalho de Pinheiro et al. (2011), foram selecionados como normalizadores dois genes, o *MDH* (*malato desidrogenase*) e o *GAPDH* (*gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase*). Ambos são considerados estáveis e de expressão constitutiva em tecidos e órgãos de *T. cacao*, proporcionando assim uma boa referência para obtenção de resultados experimentais confiáveis.

4.14. Teste dos *primers*

Os *primers* foram testados quanto a sua eficiência de amplificação utilizando um *pool* de cDNAs oriundos das 24 amostras, realizando-se as reações de RT-qPCR

seguindo os parâmetros citados no tópico 4.15. Foram analisadas as curvas de dissociação dos *amplicons* gerados por cada par de *primer*, sendo obtidas com os parâmetros *default* do equipamento 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystem). Posteriormente, selecionou-se os produtos dessas reações para visualização em eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando-se 12 µl do produto proveniente da reação, 4 µl de gel red e 1 µl de tampão de carregamento, e como marcador o 100 pb *DNA Ladder*.

4.15. Reações de RT-qPCR

A qPCR em tempo real foi feita no termociclador 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystem), utilizando o respectivo *software*. A reação foi feita em uma placa de 96 poços, utilizando 6 µl de SYBR green Taq ReadyMix, 2 µl de *primer* (*foward* e *reverse*, na concentração de 10 µM) e 4 µl de cDNA, em um volume final de 12 µl. O programa utilizado foi de 50°C por 2 minutos, 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos. Ao final foi adicionada uma etapa de curva de dissociação com os parâmetros estabelecidos pelo *software*. Os ensaios foram feitos em triplicata técnica, com um controle negativo, sem cDNA, para cada um dos genes em estudo, incluindo os genes de referência.

4.16. Cálculo de eficiência dos *primers*

Para efetuar os respectivos cálculos utilizou-se a ferramenta MINER 4.0 (ZHAO; FERNALD, 2005), usando como entrada os dados brutos de fluorescência das reações. O método utilizado por essa ferramenta permite uma determinação, de forma individual, das eficiências dos *primers* e dos Cts da reação, desconsiderando a interferência de ruídos e tornando-se desnecessário a utilização de uma curva padrão. Para cada *primer* foi obtida uma eficiência média, proveniente das suas respectivas eficiências em todos os cDNAs utilizados no experimento.

4.17. Cálculo de expressão relativa

Os Cts para cada tratamento foram obtidos mediante análise dos dados brutos de fluorescência no *software* MINER 4.0. Os valores médios dos Cts das triplicatas técnicas de cada gene foram utilizados para o cálculo de expressão relativa no *software* REST-2009 (PFAFFL, 2001). Posteriormente as análises de variância (ANOVA) e teste de

média de Scott-Knott (JELIHOVSCHI; FARIA; ALLAMAN, 2014) foram realizados no *software* RStudio (RSTUDIO TEAM, 2020).

Expressão utilizada para cálculo de expressão relativa (PFAFFL, 2001)

$$= \frac{(\text{Eficiência do gene de interesse})^{\Delta \text{Ct gene de de interesse (controle- tratado)}}}{(\text{Eficiência do gene de referência})^{\Delta \text{Ct gene de de referência (controle- tratado)}}}$$

O cálculo foi feito com os genes de referência e com os genes em estudo, sendo para ambos utilizadas suas respectivas eficiências.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises *in silico*

Os genes selecionados, mediante análises que QTLs, mineração em bibliotecas de ESTs e pesquisa em literatura tiveram suas sequências obtidas na segunda versão do genoma do cacau e posteriormente caracterizados quanto ao tamanho, localizações cromossômicas e composição de éxons e íntrons. Os genes *BI-1*, e *PR5* estão localizados no cromossomo 3, o *CRK10* e o *RAP2* no cromossomo 6, o *NB-LRR* no cromossomo 7, o *LRR-STK* e o *DRR206* no cromossomo 9. Dos genes estudados, o *DRR206* é o menor, possuindo 1.465 pb, apenas um éxon e nenhum íntron, enquanto o maior é o *NB-LRR*, contendo 8.424 pb, 21 éxons e 20 íntrons (Figura 8 e Tabela 2).

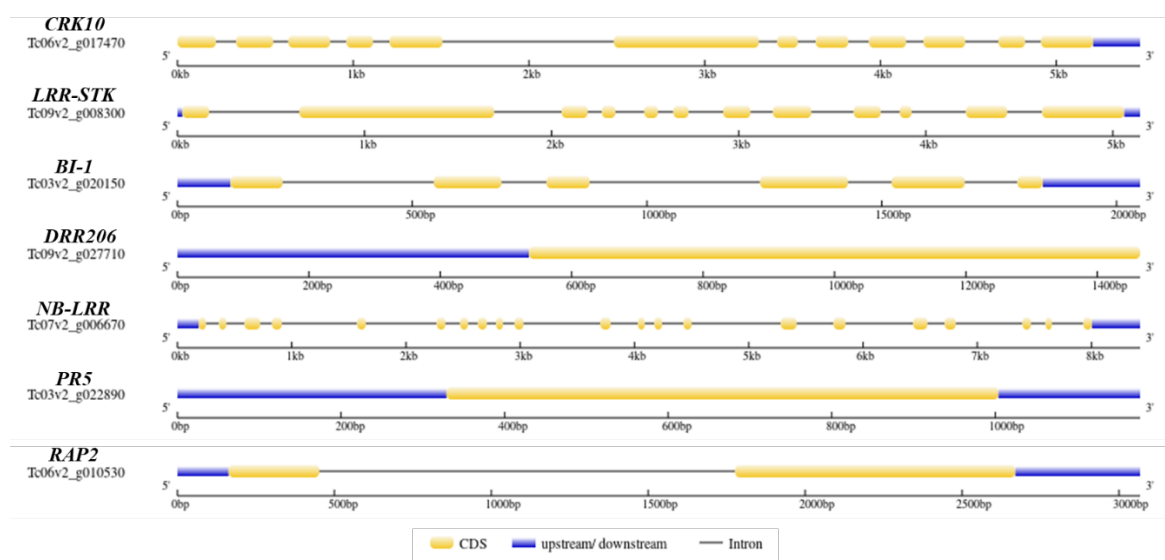


Figura 8. Representação das estruturas dos genes selecionados, explanando seus respectivos tamanhos em pb e composições de éxons e íntrons.

Tabela 2. Informações estruturais dos genes selecionados: *CRK10*, *LRR-STK*, *BI-1*, *DRR206*, *NB-LRR*, *PR5* e *RAP2*.

Gene	ID	Tamanho (pb)	Nº de éxons	Nº de íntrons
<i>CRK10</i>	Tc06v2_g017470	5.477	12	11
<i>LRR-STK</i>	Tc09v2_g008300	5.145	12	11
<i>BI-1</i>	Tc03v2_g020150	2.050	6	5
<i>DRR206</i>	Tc09v2_g027710	1.465	1	0
<i>NB-LRR</i>	Tc07v2_g006670	8.424	21	20
<i>PR5</i>	Tc03v2_g022890	1.177	1	0
<i>RAP2</i>	Tc06v2_g010530	3.067	2	1

A composição de éxons e íntrons dos genes ainda levantam questões importantes, principalmente se tais organizações são meramente estruturais, com distribuição de íntrons sem funções ao longo do genoma, ou se desempenham algum papel na expressão gênica? De acordo com Chorev e Carmel (2012), os íntrons servem potencialmente como repositórios para elementos *cis*, podendo participar tanto na organização do genoma quanto em regulações transcricionais, sendo demonstrado que em *A. thaliana* determinadas sequências de íntrons estimulam a expressão de genes (ROSE et al., 2016). Em contrapartida, se tratando especificamente de genes PRRs, íntrons grandes podem interferir negativamente em sua dinâmica evolutiva, minimizando as taxas de recombinação, tornando-os consequentemente mais estáveis (ZHOU et al., 2007).

Posteriormente, foram obtidas as sequências peptídicas provenientes do processo traducional de cada gene, sendo avaliadas quanto ao tamanho, presença de peptídeo sinal e seu respectivo tamanho, ponto isoelétrico, peso molecular e quantidades de sítios de glicosilação, acetilação e fosforilação (Tabela 3). A proteína que apresenta maior tamanho e peso molecular é a *CRK10* com 1046 aa e 116,7 kDa, enquanto a menor é a *PR5* com 224 aa e 24,3 kDa. O peso molecular é considerado um importante parâmetro para caracterização de uma molécula, sendo um indicador utilizado para diferenciar micro de macromoléculas, desempenhando considerável papel nas separações cromatográficas por exclusão de tamanho e podendo estar ainda diretamente relacionado com outras propriedades moleculares (MOLDOVEANU; DAVID, 2017).

Das sete proteínas, duas apresentam peptídeo sinal (PS), sendo estas as *DRR206* e *PR5*, contendo PS de 24 e 22 aminoácidos, respectivamente (Tabela 3). Peptídeos sinais são geralmente compostos por aproximadamente 20 aminoácidos, localizados na extremidade N-terminal das proteínas e sendo, durante a translocação das respectivas proteínas, clivados por enzimas conhecidas como peptidase sinal I ou peptidase líder. Apresentando papel principal no endereçamento das proteínas, iniciando com seu direcionamento para o retículo endoplasmático com posterior translocação através do sistema de endomembranas (DUFFAUD et al., 1985; HEJINE, 1990).

O maior ponto isoelétrico para as proteínas estudadas foi apresentado pela *BI-1* com 8,93, enquanto o menor foi exibido na *RAP2* com 4,77 (Tabela 3). O ponto isoelétrico é o valor de pH no qual a carga líquida de uma determinada proteína é igual a zero, sendo este para maioria delas ente 4,0 e 7,0, sendo usualmente usado na descrição de caráter ácido ou básico e podendo ser usado para determinar o pH para

ensaios iniciais de cristalização de proteínas (KIRKWOOD et al., 2015; MOLDOVEANU; DAVID, 2017). Sendo considerada uma poderosa ferramenta de auxílio para prever e entender interações proteína-proteína, proteína-membranas ou para determinar presença de isoformas proteicas (STEKHOVEN; FLIK, 2008).

As proteínas também foram avaliadas quanto a modificações pós-transcricionais (PTMs), considerando-se potenciais sítios de glicosilação, acetilação e fosforilação. PTMs contribuem com a diversidade de proteomas e aprimoram suas funcionalidades, desempenhando importante papel na expressão gênica e na estabilidade do produto final, sendo capazes de influenciar diretamente na eficiência de resposta do sistema imune vegetal, podendo induzir a rápidas modificações nas vias de sinalização visando uma resposta mais eficaz a depender do tipo de patógeno e/ou da intensidade da infecção (FRISO; WIJK, 2015; WITHERS; DONG, 2017).

Todas as proteínas, exceto a *DRR206* e a *PR5*, apresentaram sítios de glicosilação (Tabela 3). As *LRR-STK*, *CRK10* e *NB-LRR*, as quais são consideradas como proteínas receptoras de PAMPs e/ou efetores, são as que exibiram maiores quantidades desses sítios, com 16, 9 e 8, respectivamente. N-glicosilação contribuem para o enovelamento, estabilidade e secreção proteica e com a interação com outras proteínas (SAIJO, 2010).

Nenhuma das proteínas estudadas apresentaram sítios de acetilação (Tabela 3). Já foram demonstrados, que quando ocorrem, essas modificações podem influenciar na expressão de genes, manifestando-se principalmente em proteínas histonas, e sendo reguladas pela presença de espécies reativas de oxigênio, infecções patogênicas e estresses fisiológicos (HASHIGUSHI; KOMATSU, 2016).

A maior quantidade de sítios apresentados foram os de fosforilação, sendo demonstrada superioridade das proteínas consideradas como receptores, *LRR-STK*, *CRK10* e *NB-LRR*, com 115, 94 e 56 sítios, respectivamente (Tabela 3). A fosforilação caracteriza-se basicamente pela adição de grupos fosfatos em resíduos de serina, treonina e/ou tirosina, exercendo papel fundamental na regulação de respostas desencadeadas pelo sistema imune, estando envolvidas sobretudo na fosforilação e desfosforilação de proteínas quinases, podendo consequentemente afetar na atividade, localização e interação com outras proteínas (FRISO; WIJK, 2015; WITHERS; DONG, 2017).

Tabela 3. Dados provenientes das análises *in silico* das proteínas *LRR-STK*, *CRK10*, *BI-1*, *DRR206*, *NB-LRR*, *PR5* e *RAP2* quanto ao seu tamanho, em número de aminoácidos (aa); presença de peptídeo sinal, em número de aminoácidos (aa); ponto isoeletrico; peso molecular, em kDa; e presença de sítios de glicosilação (N), acetilação e fosforilação.

Proteína	Tamanho (aa)	Peptídeo sinal (aa)	Ponto isoeletrico	Peso molecular (kDa)	Sítios de glicosilação	Sítios de acetilação	Sítios de fosforilação*
<i>CRK10</i> (Tc06v2_p017470.1)	1046	-	5,46	116,7	N ₁₃₅ , N ₄₂₄ , N ₄₃₂ , N ₄₅₆ , N ₄₆₂ , N ₄₉₉ , N ₅₃₆ , N ₅₅₃ , N ₈₁₀	-	S ₇ , S ₁₄ , S ₂₄ , T ₃₁ , T ₃₈ , S ₃₉ , T ₄₉ , S ₅₈ , T ₇₀ , Y ₇₂ , S ₈₈ , S ₉₁ , S ₁₀₆ , Y ₁₃₀ , S ₁₃₇ , S ₁₈₆ , T ₂₁₆ , T ₂₂₂ , Y ₂₃₀ , S ₂₃₇ , S ₂₄₄ , S ₂₅₉ , Y ₂₆₂ , T ₂₆₄ , S ₂₉₄ , S ₂₉₆ , T ₃₂₀ , S ₃₃₀ , S ₃₄₆ , S ₃₅₇ , S ₃₆₂ , S ₃₇₂ , S ₃₉₁ , S ₃₉₂ , S ₃₉₃ , T ₃₉₄ , T ₃₉₆ , S ₄₀₄ , S ₄₀₇ , S ₄₃₃ , S ₄₃₄ , S ₄₄₄ , S ₄₅₁ , S ₄₅₃ , Y ₄₅₅ , S ₄₅₉ , Y ₄₆₀ , T ₄₆₄ , Y ₄₇₆ , S ₄₇₈ , T ₄₉₄ , Y ₅₁₄ , S ₅₁₅ , S ₅₄₅ , T ₅₅₅ , Y ₅₆₇ , T ₅₇₅ , Y ₅₈₁ , S ₅₉₁ , S ₆₀₇ , S ₆₀₈ , Y ₆₁₁ , S ₆₂₀ , Y ₆₃₀ , S ₆₄₀ , S ₆₄₂ , T ₆₄₃ , T ₆₆₀ , S ₆₆₃ , T ₆₈₄ , T ₇₀₀ , S ₇₁₈ , Y ₇₁₉ , T ₇₂₄ , S ₇₃₃ , S ₇₆₃ , S ₇₆₄ , S ₇₆₆ , S ₈₁₂ , S ₈₂₀ , S ₈₆₁ , S ₈₈₇ , T ₈₉₁ , T ₈₉₇ , Y ₉₀₅ , Y ₉₁₁ , S ₉₁₂ , S ₉₃₉ , T ₉₄₄ , T ₉₆₇ , Y ₉₇₇ , S ₉₉₇ , S ₁₀₁₈ , S ₁₀₃₄
<i>LRR-STK</i> (Tc09v2_p008300.2)	919	-	6,45	102,4	N ₉ , N ₈₅ , N ₁₆₅ , N ₂₀₆ , N ₂₃₂ , N ₂₈₆ , N ₃₁₉ , N ₃₂₅ , N ₃₂₉ , N ₄₀₈ , N ₄₂₀ , N ₄₂₉ , N ₄₄₂ , N ₄₅₈ , N ₅₉₀ , N ₈₉₉	-	S ₃ , S ₁₃ , S ₂₄ , S ₃₄ , T ₄₇ , Y ₄₉ , S ₅₆ , Y ₆₂ , Y ₇₁ , S ₇₃ , Y ₇₇ , T ₈₀ , S ₈₇ , S ₈₈ , Y ₉₀ , Y ₉₂ , Y ₁₁₀ , Y ₁₁₆ , T ₁₂₁ , S ₁₂₇ , S ₁₃₄ , Y ₁₃₇ , S ₁₅₉ , S ₁₆₇ , S ₁₈₀ , T ₁₉₄ , S ₁₉₈ , S ₂₀₈ , S ₂₁₁ , S ₂₁₉ , Y ₂₃₀ , Y ₂₃₄ , S ₂₃₈ , S ₂₃₉ , Y ₂₄₃ , S ₂₄₈ , S ₂₅₂ , S ₂₅₄ , S ₂₅₉ , S ₂₆₀ , S ₂₆₂ , S ₂₆₆ , S ₂₇₁ , S ₂₉₄ , T ₂₉₆ , S ₂₉₇ , S ₃₀₁ , Y ₃₀₅ , T ₃₂₁ , S ₃₂₇ , S ₃₃₁ , S ₃₄₈ , S ₃₆₁ , T ₃₆₉ , S ₃₉₀ , S ₃₉₂ , T ₄₀₄ , S ₄₁₀ , S ₄₂₂ , S ₄₃₁ , S ₄₃₃ , S ₄₄₀ , T ₄₄₄ , S ₄₄₉ , S ₄₅₃ , S ₄₆₀ , S ₄₆₁ , S ₄₆₄ , S ₄₉₇ , S ₅₂₅ , S ₅₂₇ , S ₅₄₁ , S ₅₆₄ , S ₅₆₈ , S ₅₆₉ , S ₅₇₈ , T ₅₈₄ , Y ₅₈₅ , T ₆₁₆ , S ₆₂₄ , S ₆₂₆ , S ₆₂₇ , T ₆₂₈ , S ₆₃₁ , T ₆₃₆ , S ₆₅₁ , Y ₆₅₅ , Y ₆₆₆ , S ₆₇₉ , S ₆₈₃ , S ₆₈₅ , S ₆₈₇ , S ₇₄₈ , S ₇₅₈ , T ₇₆₃ , T ₇₆₇ , Y ₇₇₅ , Y ₇₇₆ , S ₇₇₇ , Y ₇₈₈ , S ₈₁₀ , S ₈₄₂ , S ₈₅₃ , T ₈₅₄ , T ₈₅₅ , S ₈₅₈ , T ₈₆₉ , T ₈₈₆ , S ₈₉₀ , Y ₈₉₄ , S ₈₉₇ , S ₉₀₀ , S ₉₀₄ , S ₉₀₇ , T ₉₀₈
<i>BI-1</i> (Tc03v2_p020150.1)	247	-	8,93	27,4	N ₁₅	-	S ₅ , S ₆ , S ₁₂ , S ₁₄ , Y ₁₈ , T ₂₀ , S ₂₈ , T ₃₃ , T ₄₁ , S ₄₉ , T ₆₇ , S ₇₉ , Y ₈₃ , S ₉₀ , S ₉₅ , S ₁₃₃ , S ₁₅₃ , S ₁₆₆ , S ₁₇₁ , Y ₂₀₈ , S ₂₃₄ , S ₂₃₈ , S ₂₄₆
<i>DRR206</i> (Tc09v2_p027710.1)	309	24	6,07	32,3	-	-	T ₁₀ , T ₁₉ , T ₃₄ , T ₅₁ , T ₅₉ , T ₆₅ , T ₆₈ , S ₇₀ , S ₇₃ , S ₇₄ , T ₇₈ , S ₉₄ , S ₁₁₃ , S ₁₄₅ , T ₁₆₇ , T ₁₉₅ , T ₂₀₂ , S ₂₀₉ , S ₂₁₀ , S ₂₂₃ , S ₂₂₈ , S ₂₅₁ , T ₂₇₁ , Y ₂₈₀ , T ₂₉₄ , T ₂₉₉
<i>NB-LRR</i> (Tc07v2_p006670.1)	584	-	5,53	64,0	N ₁₅ , N ₁₈ , N ₇₄ , N ₁₉₀ , N ₂₈₄ , N ₂₉₆ , N ₃₈₇ , N ₄₂₉	-	S ₁₁ , S ₁₃ , S ₁₇ , S ₂₀ , S ₅₉ , T ₈₁ , T ₁₁₄ , S ₁₁₅ , S ₁₂₃ , S ₁₃₂ , S ₁₄₀ , S ₁₅₁ , T ₁₆₃ , S ₁₈₂ , S ₂₂₁ , S ₂₃₁ , S ₂₄₃ , S ₂₅₁ , S ₂₅₃ , T ₂₅₇ , Y ₂₆₈ , S ₂₇₈ , S ₂₈₆ , T ₂₉₉ , T ₃₁₂ , S ₃₁₅ , S ₃₁₆ , T ₃₂₂ , S ₃₃₁ , S ₃₃₄ , S ₃₃₉ , T ₃₄₃ , S ₃₅₇ , T ₃₅₉ , S ₃₆₀ , S ₃₆₄ , S ₃₇₁ , S ₃₈₀ , S ₃₉₂ , T ₄₀₈ , S ₄₂₆ , S ₄₄₅ , S ₄₅₂ , S ₄₆₅ , S ₄₇₄ , S ₄₉₇ , S ₅₁₀ , S ₅₁₃ , S ₅₂₀ , T ₅₂₂ , S ₅₂₃ , S ₅₃₀ , S ₅₃₅ , S ₅₄₇ , S ₅₆₀ , S ₅₇₀
<i>PR5</i> (Tc03v2_p022890.1)	224	22	8,12	24,3	-	-	T ₅ , S ₇ , T ₆₃ , T ₇₁ , T ₈₅ , Y ₉₇ , T ₁₀₃ , S ₁₁₄ , S ₁₂₁ , S ₁₃₃ , S ₁₃₆ , S ₁₄₂ , Y ₁₇₅ , T ₁₉₃ , Y ₁₉₉ , S ₂₀₀
<i>RAP2</i> (Tc06v2_p010530.1)	393	-	4,77	43,8	N ₂₆₂	-	S ₈ , T ₁₆ , T ₂₀ , T ₂₉ , S ₃₁ , S ₃₃ , S ₃₇ , S ₄₂ , T ₆₄ , S ₈₅ , T ₈₇ , S ₉₂ , S ₉₅ , S ₉₈ , S ₁₀₀ , S ₁₀₃ , S ₁₁₃ , Y ₁₂₂ , T ₁₅₀ , T ₁₅₃ , S ₁₈₅ , S ₁₉₄ , S ₁₉₇ , S ₁₉₉ , S ₂₀₄ , Y ₂₁₆ , S ₂₁₈ , Y ₂₂₄ , T ₂₂₇ , Y ₂₄₂ , S ₂₄₉ , S ₂₆₀ , S ₂₆₄ , Y ₂₆₆ , S ₂₇₅ , S ₂₇₉ , T ₂₉₀ , S ₂₉₅ , S ₃₀₀ , S ₃₀₃ , S ₃₁₉ , S ₃₂₀ , T ₃₂₄ , S ₃₃₀ , S ₃₃₃ , S ₃₃₅ , T ₃₇₀ , S ₃₈₁

*S = resíduo de serina; T = resíduo de treonina; Y = resíduo de tirosina.

Utilizando a ferramenta DeepLoc, foram preditas as localizações para as seis proteínas estudadas (Tabela 4).

Tabela 4. Localização celular das proteínas *CRK10*, *LRR-STK*, *BI-1*, *DRR206*, *NB-LRR*, *PR5* e *RAP2*.

Proteína	ID	Localização	(%)
<i>CRK10</i>	Tc06v2_p017470.1	Membrana plasmática	99,21
<i>LRR-STK</i>	Tc09v2_p008300.2	Membrana plasmática	99,86
<i>BI-1</i>	Tc03v2_p020150.1	Membrana do retículo endoplasmático	73,46
<i>DRR206</i>	Tc09v2_p027710.1	Espaço extracelular	92,07
<i>NB-LRR</i>	Tc07v2_p006670.1	Citoplasma	78,05
<i>PR5</i>	Tc03v2_p022890.1	Espaço extracelular	72,05
<i>RAP2</i>	Tc06v2_p010530.1	Núcleo	88,65

% = probabilidade da localização

Foi estabelecido que as *LRR-STK* e *CRK10* localizam-se na membrana plasmática. Receptores do tipo RLKs e/ou RLPs normalmente apresentam tal localização, caracterizando-se ainda pela presença de um domínio extracelular responsável pelo reconhecimento do sinal elicitor, um domínio transmembrana, e podendo ou não conter um domínio quinase intracelular responsável pela transdução do sinal e ativação das cascatas de sinalização (MONAGHAN; ZIPFEL, 2012).

Para a proteína *BI-1* foi estabelecido que sua provável localização é na membrana do retículo endoplasmático. Essa localização corrobora com resultados encontrados em trabalhos anteriores, nos quais demonstraram-se que a *BI-1* é uma proteína transmembranar, localizada mais precisamente na membrana do retículo endoplasmático (LI et al., 2014; LISAK et al., 2015).

A proteína *NB-LRR* situa-se no citoplasma. Receptores que apresentam tal localização são responsáveis, na maioria das vezes, pelo reconhecimento, direto ou indireto, de efetores citoplasmáticos secretados por patógenos e posterior desencadeamento das cascatas de sinalização, o que pode resultar consequentemente em uma resposta de resistência (CAPLAN et al., 2008).

As *DRR206* e *PR5* são endereçadas para o meio extracelular. Proteínas que possuem peptídeos sinais são geralmente secretadas via sistema de endomembranas, sendo sintetizadas no retículo endoplasmático; transportadas para complexo de Golgi, onde sofrem modificações; as proteínas são entregues na face *trans* do complexo de Golgi, onde são ordenadas à membrana para serem secretadas; e através de vesículas secretoras fusionadas à membrana plasmática, as proteínas são exportadas ao meio

extracelular (CUI et al., 2020; FAN et al., 2015). Analisando interações envolvendo estresse bióticos, foram detectadas 27% das proteínas secretadas estão envolvidas com respostas a estímulos e 19% participando na síntese e organização da parede celular (GUERRA-GUIMARÃES et al., 2016).

A proteína *RAP2* situa-se no núcleo. Proteínas localizadas no núcleo desempenham papel importante no armazenamento, expressão, replicação, reparação e transmissão de informações às novas células formadas (PETROVSKÁ; ŠEBELA; DOLEŽEL, 2015). Dentre essas estão inseridos os fatores de transcrição, que ao atuar na regulação de expressão de determinados genes podem desencadear a ativação de complexas redes de sinalização ligadas com ativação de respostas a determinados estresses (CHEN et al., 2017; FRANCO-ZORRILLA; SOLANO, 2017). Para o *RAP2* já foi demonstrado, em *A. thaliana*, a sua localização no núcleo celular (KIM; JANG; PARK, 2018).

Foram realizadas também a seleção de proteínas ortólogas no genoma de *A. thaliana*, sendo escolhida esta espécie pelo fato de ser uma planta modelo para realização de análises genômicas (MEINKE et al., 1998). As proteínas selecionadas apresentaram coberturas variáveis entre 93 e 100%, com exceção da *DRR206* que apresentou 74%; e identidades entre 44 e 79%, sendo esses valores validados mediante BlastP recíproco. As ortólogas das *CRK10*, *LRR-STK*, *BI-1*, *DRR206*, *NB-LRR*, *PR5* e *RAP2* em *A. thaliana* podem ser acessadas com os IDs NP_567679.2, ACN59351.1, AAM65074.1, NP_181475.1, NP_188160.2, NP_192902.1 e OAP06223.1, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Proteínas ortólogas selecionadas no genoma de *A. thaliana* e suas respectivas taxas de cobertura e identidade.

Proteína em <i>T. cacao</i>	Ortólogas em <i>A. thaliana</i> (Nº ID)	Cobertura (%)	Identidade (%)	BlastP recíproco	
				Cobertura (%)	Identidade (%)
<i>CRK10</i>	NP_567679.2	93,0	44,0	97,0	44,0
<i>LRR-STK</i>	ACN59351.1	94,0	55,0	97,0	55,0
<i>BI-1</i>	AAM65074.1	95,0	79,0	95,0	80,0
<i>DRR206</i>	NP_181475.1	74,0	58,0	72,0	57,0
<i>NB-LRR</i>	NP_188160.2	100,0	73,0	100,0	73,0
<i>PR5</i>	NP_192902.1	100,0	65,0	91,0	65,0
<i>RAP2</i>	OAP06223.1	100,0	49,0	100,0	50,0

Posteriormente, para verificar as redes de interações com outras proteínas, submeteu-se os respectivos números de ID das ortólogas na ferramenta STRING,

verificando-se presença de interações diretas e indiretas para cada proteína com outras que também estão potencialmente envolvidas com o desencadeamento de respostas de resistência na planta.

A *CRK10* apresenta como ortóloga, em *A. thaliana*, a *CRK10* (Figura 9). Observou-se relevantes interações com outras proteínas, sobressaindo-se com as: *SOBIR1*, envolvida com a ativação de respostas de defesa e morte celular (GAO et al., 2009; VAN DER BURGH et al., 2019); *KAPP*, uma quinase associada com o processo de fosforilação de outras proteínas (WILLIAMS; WILSON; MEYEROWITZ, 1997); *ZAR1*, proteína receptora envolvida com o reconhecimento e atenuação da virulência de *HopZ1a* (efetor de *Pseudomonas syringae*), a imunidade mediada por *ZAR1* é independente de outras vias de sinalização (LEWIS et al., 2010); *CaMK1*, possivelmente envolvida com a transdução de sinais que envolve cálcio como mensageiro secundário (VALMONTE et al., 2014).

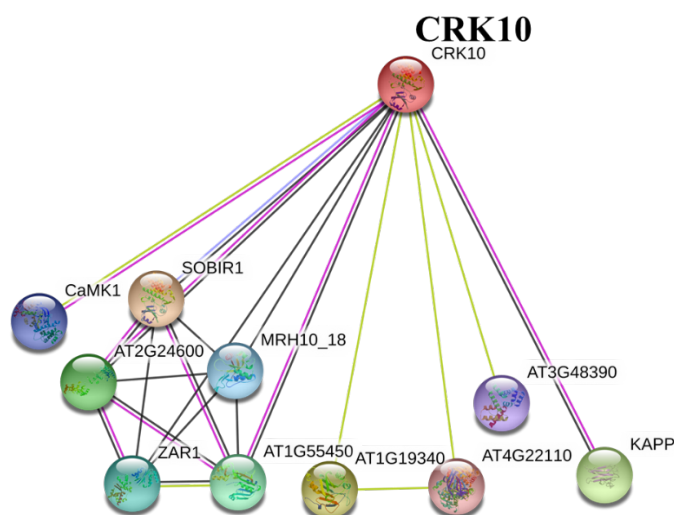


Figura 9. Rede de interação da proteína *CRK10* em *A. thaliana*, ortóloga da *CRK10* de *T. cacao*.

A proteína *LRR-STK* tem como ortóloga, em *A. thaliana*, a *RHS16* (Figura 10). Foram demonstradas importantes interações com outras proteínas, destacando-se: *RHS12*, envolvida na modificação de paredes celulares (UNO et al., 2017); *AT4G08410*, atua na organização da parede celular (REEM et al., 2018); *XTH14*, cliva e religa os polímeros de xiloglucano (CAMPBELL; BRAAM, 1999); e as *RHS19* e *AT3G49960*, responsáveis pela biossíntese e degradação de lignina, suberização e respostas a estresses ambientais, como ferimentos, ataque de patógenos e estresse oxidativo (TOGNOLLI et al., 2002).

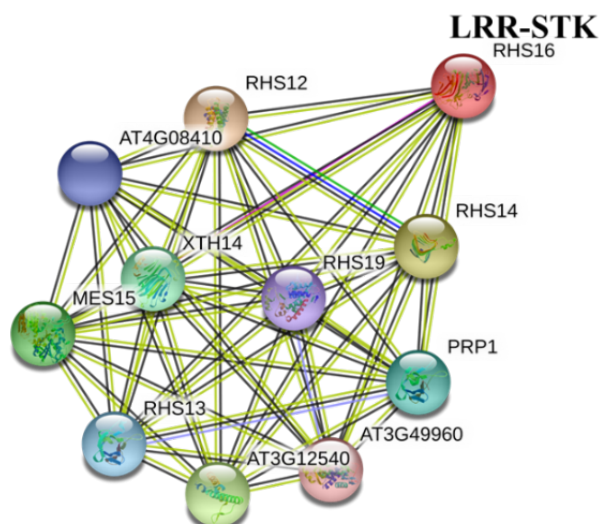


Figura 10. Rede de interação da proteína *RRS16* em *A. thaliana*, ortóloga da *LRR-STK* de *T. cacao*.

A *BI-1* apresenta como ortóloga, em *Arabidopsis*, a proteína também nomeada *BI-1* (Figura 11). Esta interage com outras proteínas, ressaltando as: *BAG7*, que está implicada com respostas a ataques de patógenos, estresses ambientais e desenvolvimento de plantas (KANG et al., 2006); *BZIP60*, considerada um promotor de chaperonas, sendo também responsável por respostas a estresses bióticos e abióticos (GAGUANCELA et al., 2016); *AT4G15470* e *AT1G03070*, outras proteínas da família *Bax-Inhibitor 1* que atuam como inibidores de apoptose (KAWAI-YAMADA et al., 2001); *CAM7*, mediadora no controle de várias enzimas, canais iônicos e outras proteínas por Ca^{2+} (TAKAHASHI et al., 2011); e as *T29F13.2* e *FAH2*, envolvidas em respostas de resistência a estresses oxidativos (NAGANO et al., 2012).

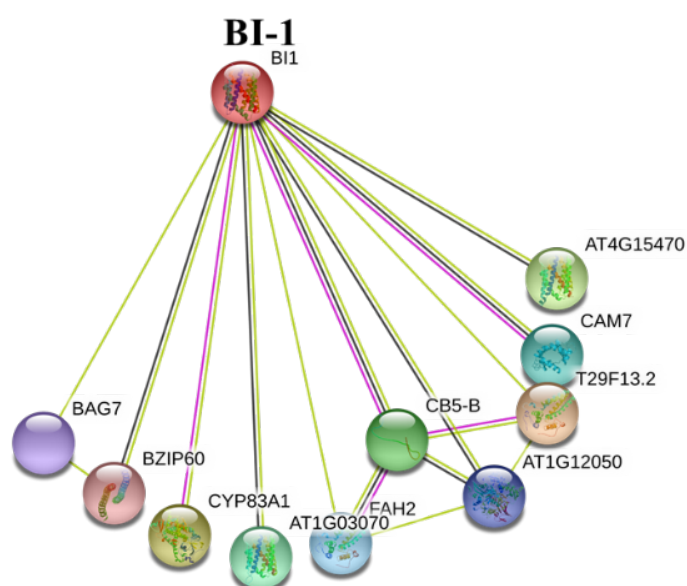


Figura 11. Rede de interação da proteína *BI-1* em *A. thaliana*, ortóloga da *BI-1* de *T. cacao*.

A *DRR206* tem como ortóloga, no genoma de *Arabidopsis*, a proteína *AT2G39430* (Figura 12). Todas as 10 interações observadas ocorreram com outros membros da família *Dirigent protein*, sendo estas as *DIR5*, *DIR6*, *AT3G58090*, *AT4G11190*, *AT3G10660*, *AT4G11210*, *ATG07740*, *AT3G13662*, *AT1G55210* e *AT5G49040*, essas proteínas são envolvidas, basicamente, com a síntese de mecanismos pós-formados, destacando-se com a biossíntese de ligninas e alcaloides e regulação da acumulação de suberina (HOSMANI et al., 2013).

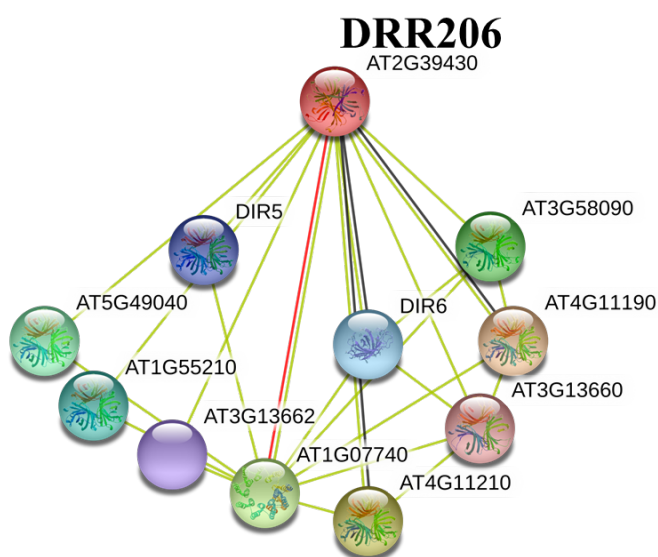


Figura 12. Rede de interação da proteína *AT2G39430* em *A. thaliana*, ortóloga da *DRR206* de *T. cacao*.

A *NB-LRR* apresenta como ortóloga, em *A. thaliana*, a proteína *AT3G15410* (Figura 13). São notadas a presença de complexas interações, direta e indiretamente, com outras proteínas, destacando-se com: *AT4G16640*, envolvida na degradação e remodelação da matriz extracelular durante o desenvolvimento ou em resposta a estresses (MAIDMENT et al., 1999); *CDC5*, implicada com a regulação de resposta de defesa através do controle transcricional (PALMA et al., 2007); e as *AT4G16140*, *AT1G48660* e *GH3.4*, potencialmente envolvidas com no controle da auxina (PARK et al., 2007).

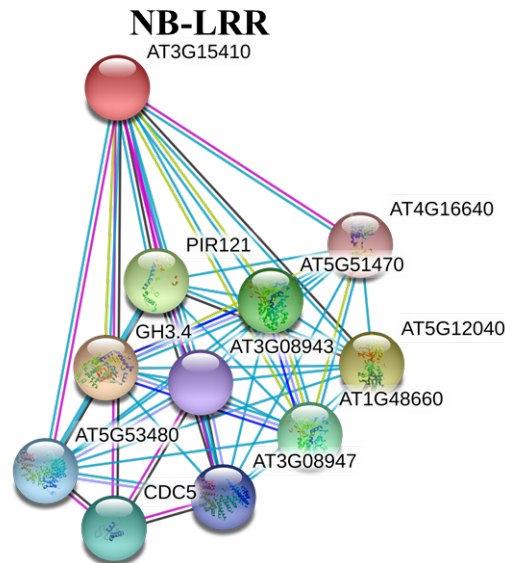


Figura 13. Rede de interação da proteína *AT3G15410* em *A. thaliana*, ortóloga da *NB-LRR* de *T. cacao*.

A *PR5* tem como ortóloga, no genoma de *Arabidopsis*, a proteína *OSM34* (Figura 14). São observadas interações com proteínas, basicamente, envolvidas com respostas a estresses, destacando-se entre estas: *HCHIB*, pertencente a famílias das quitinases, é envolvida com respostas de defesa contra fungos que contêm quitina (PASSARINHO; DE VRIES, 2002); *KIT1*, inibidor de protease que atua na modulação de PCD em interações planta-patógeno (LI et al., 2008); *DOX1*, media respostas contra estresse oxidativo e PCD e promove o estabelecimento de resistência sistêmica adquirida (DE LÉON et al., 2002); e as *AT2G15220* e *AT4G16260*, sendo também envolvidas com respostas de defesa contra patógenos (HAMAMOUCHE et al., 2012).

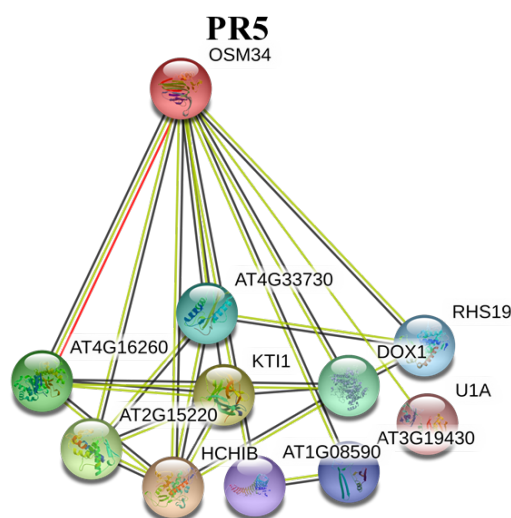


Figura 14. Rede de interação da proteína *OSM34* em *A. thaliana*, ortóloga da *PR5* de *T. cacao*.

A *RAP2* tem como ortóloga, em *A. thaliana*, a proteína *RAP2.2* (Figura 15). Esta interage com outras proteínas, ressaltando as: *SINAT2*, que media a ubiquitinação e subsequente degradação de proteínas alvos (QI et al., 2017); *ATE2*, envolvida na resistência a doenças, desempenha papel na regulação da duração e amplitude de respostas de defesa à infecções bacterianas e regula a biossíntese de metabólitos envolvidos no sistema de defesa (DE MARCHI et al., 2016); *PRT6*, apresenta importante papel no sistema imune vegetal (DE MARCHI et al., 2016), controla a expressão de genes específicos no sistema de defesa e influencia na resistência basal contra patógenos hemibiotróficos (VICENTE et al., 2019).

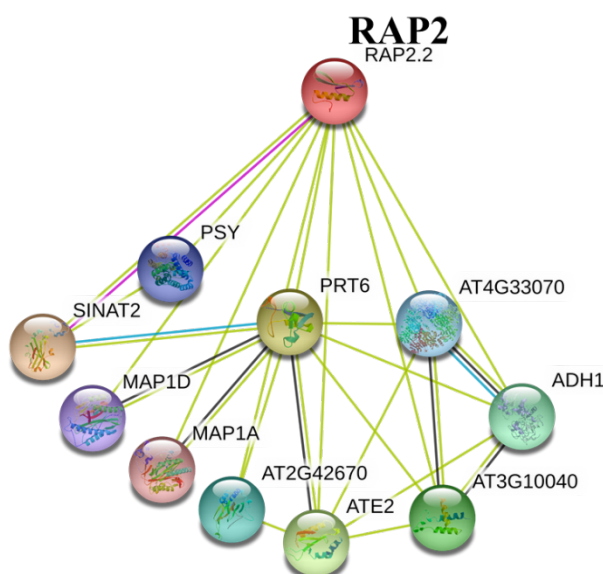


Figura 15. Rede de interação da proteína *RAP2.2* em *A. thaliana*, ortóloga da *RAP2* de *T. cacao*.

Observa-se que todas as proteínas apresentam elevadas quantidades de interações diretas e indiretas, sendo assim consideradas como possíveis *hubs* e justificando seu essencial papel no desencadeamento de defesas que podem resultar em um fenótipo resistente ao fungo *C. cacaofunesta*. De acordo com McCormark et al. (2016), um grupamento de proteínas, quando altamente conectadas, são consideradas como *hubs* e, na maioria das vezes, indicam que estão envolvidas em processos funcionais semelhantes. A compreensão dessas redes de interações contribuem potencialmente em variadas aplicações práticas, principalmente quando aplicadas para auxiliar na compreensão da dinâmica do sistema imune das plantas, e consequentemente na elucidação do desenvolvimento dos mecanismos de resistência.

No contexto biológico, proteínas que participam em cascatas de sinalização apresentam grande número de interações, direta e indiretas, entre elas, sendo que uma falha nessas conexões pode ter sérios efeitos posteriores, sobretudo quando são consideradas *hubs* (MCCORMARK et al. 2016; MIZUTAKA; YAKUBO, 2015). Geralmente são proteínas altamente conservadas e que desempenham papéis fundamentais no processo celular, sendo que o mal funcionamento destas podem ocasionar na planta, quando infectadas por patógenos virulentos, um fenótipo suscetível (MCCORMARK et al. 2016; RANGARAJAN et al., 2015).

5.2. Inoculação das plantas

Para verificação da interação *in vivo*, os genótipos TSH1188 (resistente) e CC51 (suscetível) foram inoculados com o isolado Cf20 de *C. cacaofunesta*. Os sintomas característicos da doença começaram a se manifestar, no genótipo suscetível, a partir do sétimo dia após a inoculação, agravando-se até o 15º dia, onde as plantas, nos galhos superiores ao ponto de inoculação, demonstravam-se com completamente murchas (Figura 16).

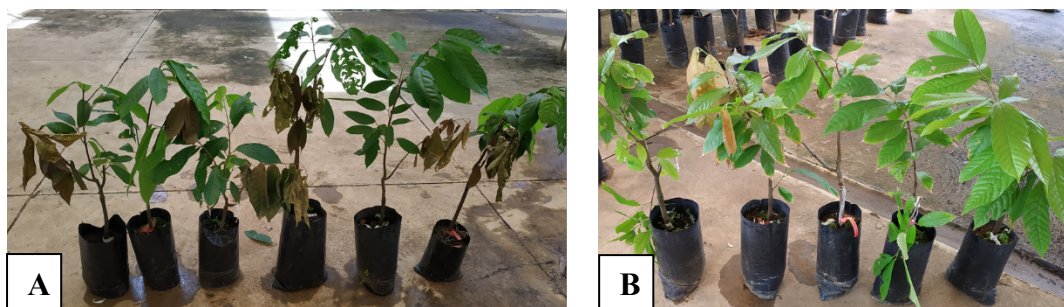


Figura 16. Sintomas manifestados pelos genótipos CCN51 (A) e TSH1188 (B) de *T. cacao* 15 dias após a infecção pelo fungo *C. cacaofunesta*.

Os sintomas são condizentes aos demonstrados no trabalho de Santos et al. (2013a), caracterizando-se pela obstrução dos vasos condutores, impedindo o transporte de seiva bruta do sistema radicular à parte aérea, provocando a murcha e subsequente seca das folhas na parte aérea da planta, permanecendo-as aderidas à planta mesmo após alguns dias após a morte do galho infectado (Figura 17).

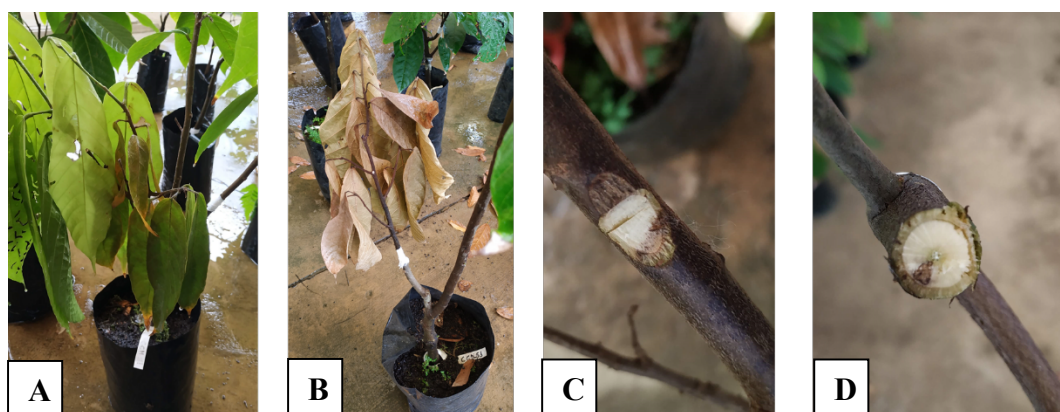


Figura 17. Sintomas manifestados pelo genótipo CCN51 (A) de *T. cacao* inoculados com o fungo *C. cacaofunesta*. Sintomas de murcha aos 7 dai (A), murcha acentuada a 15 dai (B) e obstrução dos vasos xilemáticos (C e D).

5.3. Primers para RT-qPCR

Para a análise de expressão gênica foram desenhados pares de *primers* para os seis genes selecionados (Tabela 6). Ressalta-se que os *primers* utilizados para os dois genes endógenos utilizados foram previamente estabelecidos por Pinheiro et al., 2011, sendo: GAPDH_*foward* (TCT TCC TCC TCT CCA GTC CTT) e GAPDH_*reverse* (GAT GCT CCT ATG TTT GTT GTG G); MDH_*foward* (AAC CAT GAC TGC GAT GTT GA) e MDH_*reverse* (AAA ATG GAG TTG GTG GAT GC).

Tabela 6. Dados referentes aos *primers* para RT-qPCR desenhados: *BI-1*, *CRK*, *DRR206*, *LRR-STK2*, *NB-LRR* e *RAP2*.

Nome do primer	Sequência	Tamanho do primer (nt)	Tm (°C) Oligoanalyzer default	% GC	Tamanho do amplicon (pb)	% GC do amplicon
<i>BI-1_F</i>	TGCATTTGTGGGAACAGCTCTG	22	58,1	50	107	49,5
<i>BI-1_R</i>	ACACACCAGATGAAAGCAAGCC	22	58,2	50		
<i>CRK_F</i>	AAGGGCAGCCTTCAATTCTTCAAC	24	58,1	45,8	80	43,8
<i>CRK_R</i>	TAGCATACAGGGTGTCTCTGCTG	24	58,5	50		
<i>DRR206_F</i>	CACACAGATGGGATGGAAATGGG	23	58,1	52,2	94	47,9
<i>DRR206_R</i>	TGGACTTGGACATACCGATTGTGAC	25	58,7	48		
<i>LRR-STK2_F</i>	GGCAAGCACTACACCAAGTTCC	22	58,6	54,5	87	48,3
<i>LRR-STK2_R</i>	GACAACTCCATGTCCAAGCACTG	23	58,8	52,2		
<i>NB-LRR_F</i>	GGGATGGGCACAGATGACAG	20	58,1	60	141	41,1
<i>NB-LRR_R</i>	CAAGAATGGAGCAGTGATCTGGC	23	58,1	52,2		
<i>RAP2_F</i>	ATGTGTGGAGGTGCGATTATCTCC	24	58,7	50	176	52,8
<i>RAP2_R</i>	AACTCCTGAAAGTCAGCCTCGAAG	24	58,7	50		

Os *primers* obtidos apresentam tamanhos entre 20 a 25 nt, temperaturas de Melting em torno de 58°C e porcentagens de GC variando de 45,8 a 60%. Já para os *amplicons*, são esperados tamanhos de 80 pb (gene *CRK10*) a 176 pb (gene *RAP2*) e as porcentagens de GC de 41,1 a 52,8.

5.4. Tm e curvas de dissociação preditas *in silico* para os amplicons

Utilizando a ferramenta uMELT (DWIGHT; PALAIS; WITTEWER, 2011), foram preditas as Tm e curvas de dissociação para os amplicons gerados por cada um dos oito pares de *primers* utilizados (Figura 18).

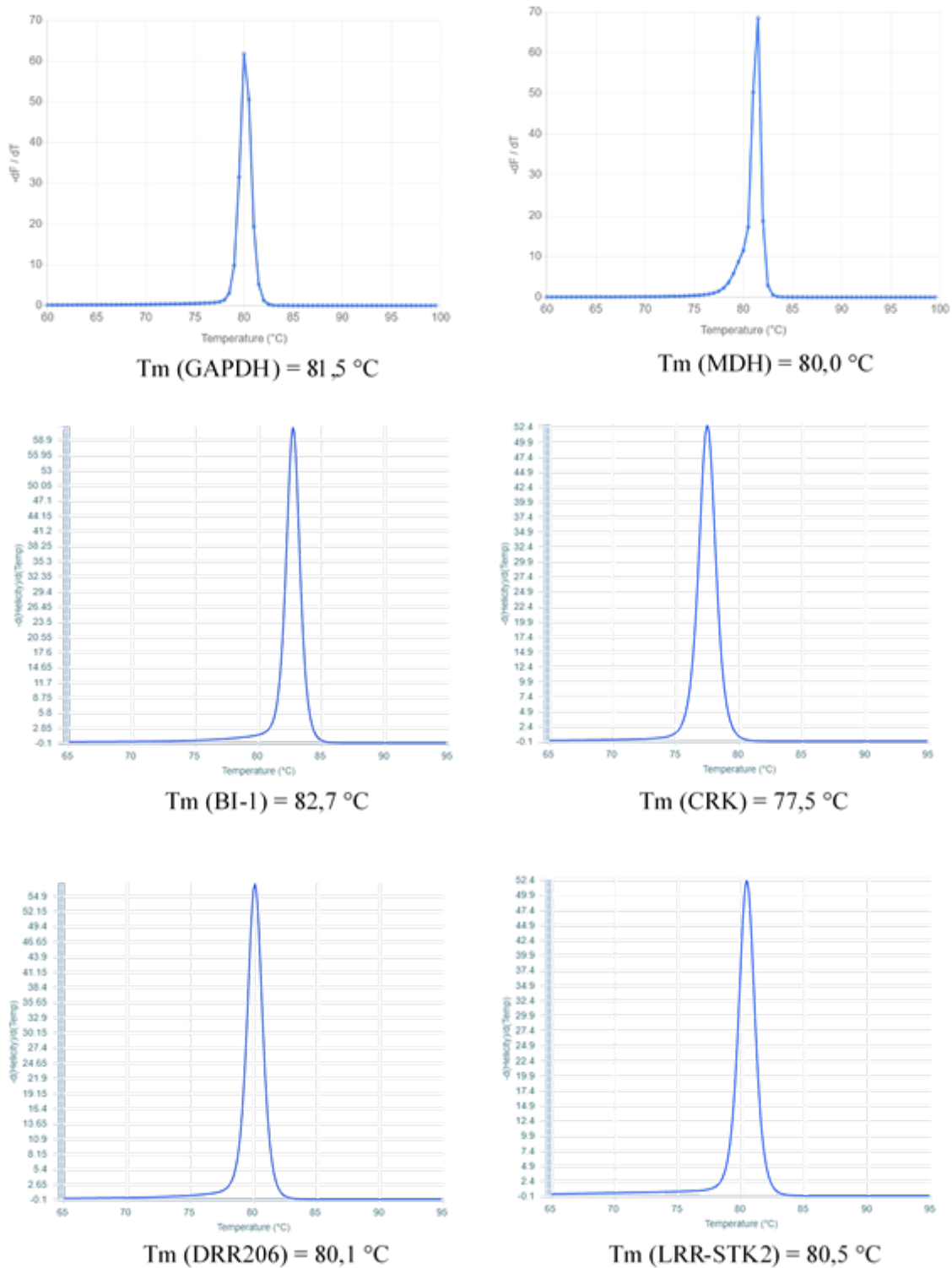


Figura 18. Tm e curvas de dissociação preditas para os amplicons gerados pelos sete pares de *primers* utilizados: GAPDH, MDH, BI-1, CRK, DRR206, LRR-STK2, RAP2 e NB-LRR.

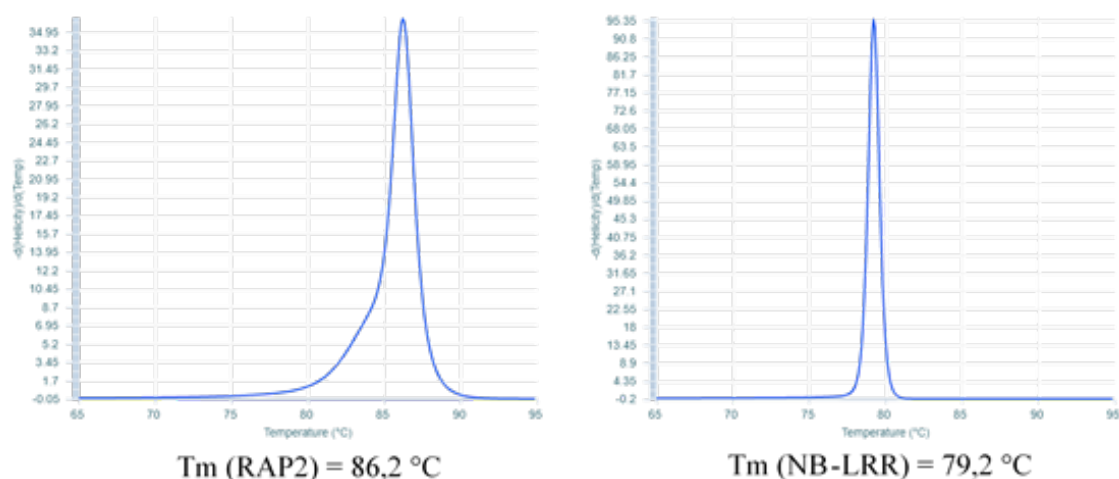


Figura 18_continuação. T_m e curvas de dissociação preditas para os amplicons gerados pelos sete pares de *primers* utilizados: GAPDH, MDH, BI-1, CRK, DRR206, LRR-STK2, RAP2 e NB-LRR.

Espera-se que para os *primers* desenhados as T_m dos fragmentos amplificados fiquem entre 77,5 °C (CRK) e 86,2 °C (RAP2), ocorrendo a formação de curvas de dissociações com picos bem definidos.

5.5. Checagem das famílias gênicas

Utilizando como base as sequências peptídicas referentes a cada gene em estudo, foram obtidos os genes das quais foram originadas e posteriormente estabelecidas suas possíveis famílias gênicas (Tabela 7). Obteve-se que no genoma de *T. cacao*, o *BI-1* (Tc03v2_g020150) possui dois homólogos, o *DRR206* (Tc09v2_g027710) possui 32 homólogos, o *LRR-STK* (Tc09v2_g008300) possui 37 homólogos, o *CRK10* (Tc06v2_g017470) possui 20 homólogos, o *PR5* (Tc03v2_g022890) possui 24 homólogos, o gene *NB-LRR* (Tc07v2_g006670) possui apenas um homólogo e o *RAP2* (Tc06v2_g010530) possui 114 homólogos.

Tabela 7. Identificação dos membros da família gênica a qual pertence cada um dos genes selecionados.

Gene alvo	Número de homólogos	IDs dos homólogos
Tc03v2_g020150 (<i>BI-1</i>)	2	Tc04v2_g022140.1; Tc01v2_g022660.1
Tc09v2_g027710 (<i>DRR206</i>)	32	Tc05v2_g014890; Tc05v2_g014930; Tc02v2_g005170; Tc02v2_g005090; Tc04v2_g017450; Tc02v2_g005060; Tc02v2_g005100; Tc02v2_g005070; Tc09v2_g017970; Tc09v2_g017980; Tc10v2_g000460; Tc03v2_g024180; Tc02v2_g005150; Tc10v2_g004840; Tc03v2_g008840; Tc09v2_g027700; Tc10v2_g004820; Tc03v2_g024220; Tc02v2_g005160; Tc05v2_g014920; Tc02v2_g005130; Tc03v2_g024190; Tc10v2_g000470; Tc02v2_g005080; Tc02v2_g005110; Tc08v2_g001550; Tc03v2_g024200; TcUnv2_g002460; Tc01v2_g000520; Tc10v2_g004850; Tc06v2_g008670; Tc02v2_g005140

Tc09v2_g008300 (LRR-STK)	37	Tc02v2_g006430; Tc01v2_g005660; Tc10v2_g005100; Tc06v2_g008420; Tc04v2_g008450; Tc04v2_g008510; Tc02v2_g028090; Tc01v2_g005680; Tc06v2_g015770; Tc06v2_g008480; Tc02v2_g023400; Tc01v2_g005670; Tc04v2_g008380; Tc07v2_g006250; Tc06v2_g008510; Tc04v2_g008390; Tc04v2_g008520; Tc03v2_g015240; Tc04v2_g008400; Tc01v2_g005640; Tc06v2_g008560; Tc02v2_g028060; Tc04v2_g008480; Tc09v2_g027860; Tc04v2_g008410; Tc04v2_g012010; Tc10v2_g004300; Tc01v2_g018740; Tc06v2_g008450; Tc05v2_g004680; Tc04v2_g024750; Tc09v2_g027850; Tc04v2_g008460; Tc06v2_g000390; Tc05v2_g023300; Tc01v2_g005650; Tc06v2_g008430
Tc06v2_g017470 (CRK10)	20	Tc06v2_g017350; Tc04v2_g001160; Tc06v2_g017400; Tc03v2_g001160; Tc06v2_g017370; Tc06v2_g017250; Tc06v2_g017440; Tc04v2_g021050; Tc06v2_g004720; Tc06v2_g017290; Tc06v2_g017360; Tc04v2_g001170; Tc06v2_g017320; Tc06v2_g017380; Tc06v2_g017340; Tc10v2_g012610; Tc06v2_g017330; Tc06v2_g017300; Tc02v2_g022270; Tc02v2_g022260
Tc03v2_g022890 (PR5)	24	Tc02v2_g004950; Tc04v2_g005870; Tc03v2_g022930; Tc03v2_g022940; Tc04v2_g016230; Tc03v2_g022870; Tc09v2_g027270; Tc05v2_g006210; Tc08v2_g003840; Tc05v2_g006160; Tc01v2_g001480; Tc10v2_g003150; Tc03v2_g003960; Tc05v2_g006170; Tc02v2_g004960; Tc05v2_g006150; Tc03v2_g022900; Tc08v2_g003860; Tc05v2_g003140; Tc01v2_g001470; Tc08v2_g010110; Tc03v2_g022910; Tc02v2_g003030; Tc08v2_g001700
Tc07v2_g006670 (NB-LRR)	1	Tc07v2_g006620
Tc06v2_g010530 (RAP2)	114	Tc01v2_g025510; Tc01v2_g025460; Tc04v2_g023850; Tc01v2_g004800; Tc02v2_g016330; Tc02v2_g008150; Tc04v2_g004130; Tc03v2_g011610; Tc03v2_g020400; Tc03v2_g012350; Tc01v2_g021590; Tc01v2_g033230; Tc01v2_g033200; Tc06v2_g015090; Tc03v2_g024410; Tc09v2_g030660; Tc03v2_g012660; Tc06v2_g014630; Tc06v2_g014640; Tc04v2_g020680; Tc03v2_g012340; Tc04v2_g020700; Tc01v2_g033220; Tc04v2_g020690; Tc03v2_g020620; Tc05v2_g022800; Tc10v2_g010070; Tc05v2_g022810; Tc03v2_g020360; Tc01v2_g021610; Tc01v2_g021580; Tc06v2_g015070; Tc04v2_g016540; Tc01v2_g032670; Tc01v2_g028550; Tc07v2_g002530; Tc08v2_g000250; Tc02v2_g015570; Tc06v2_g003080; Tc07v2_g007820; Tc03v2_g015920; Tc01v2_g033210; Tc09v2_g003890; Tc09v2_g008940; Tc05v2_g000590; Tc08v2_g014220; Tc05v2_g022180; Tc08v2_g014230; Tc05v2_g013630; Tc01v2_g029120; Tc01v2_g008980; Tc02v2_g014960; Tc09v2_g001630; Tc06v2_g007900; Tc08v2_g009280; Tc01v2_g010090; Tc01v2_g005320; Tc02v2_g022690; Tc08v2_g002910; Tc07v2_g011970; Tc04v2_g004280; Tc10v2_g006970; Tc06v2_g002900; Tc09v2_g006400; Tc08v2_g015040; Tc05v2_g007130; Tc03v2_g024800; Tc10v2_g001150; Tc09v2_g006410; Tc09v2_g010920; Tc04v2_g023020; Tc09v2_g005780; Tc02v2_g016070; Tc10v2_g006860; Tc10v2_g006840; Tc09v2_g024230; Tc03v2_g014000; Tc03v2_g014010; Tc03v2_g022630; Tc03v2_g009340; Tc06v2_g001850; Tc09v2_g002240; Tc03v2_g017880; Tc03v2_g012360; Tc02v2_g029230; Tc09v2_g017400; Tc05v2_g020760; Tc04v2_g007430; Tc08v2_g016440; Tc01v2_g021620; Tc01v2_g030940; Tc05v2_g007150; Tc02v2_g030500; Tc03v2_g022620; Tc08v2_g010320; Tc03v2_g002470; Tc08v2_g014040; Tc02v2_g030930; Tc04v2_g011260; Tc09v2_g018940; Tc01v2_g005290; Tc09v2_g014850; Tc05v2_g015680; Tc08v2_g007140; Tc06v2_g009800; Tc10v2_g005400; Tc01v2_g006740; Tc09v2_g028270; Tc05v2_g004650; Tc10v2_g010450; Tc09v2_g018300; Tc05v2_g025550; Tc06v2_g003810; Tc01v2_g007690

5.6. Alinhamento das sequências e teste *in silico* para verificar a especificidade dos primers

Após identificação das famílias gênicas de cada um dos genes selecionados (Tabela 7), foram realizados alinhamentos entre os seus membros para que assim fossem destacados os locais menos conservados onde foram desenhados cada par de *primer* (Figuras 19 a 24).

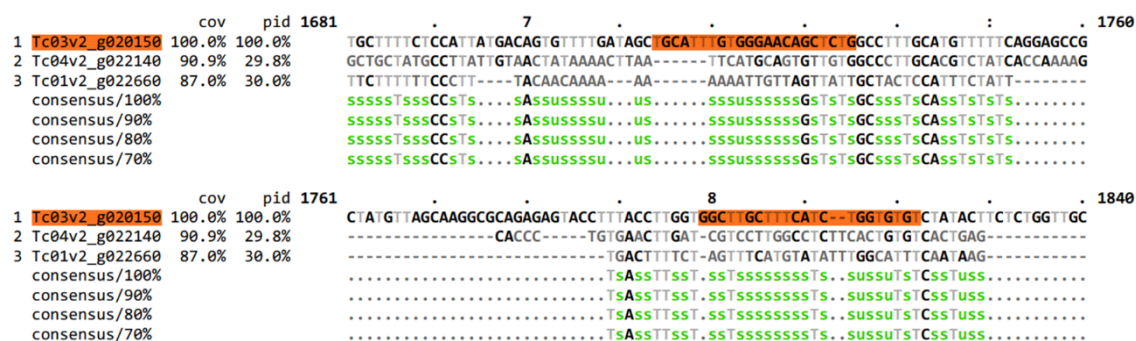


Figura 19. Alinhamento dos genes identificados na família gênica do *BI-I*. Sendo destacado o gene o gene selecionado para este trabalho e o respectivo local onde foi desenhado o par de *primer*.



Figura 20. Alinhamento dos genes identificados na família gênica do *NB-LRR*. Sendo destacado o gene o gene selecionado para este trabalho e o respectivo local onde foi desenhado o par de *primer*.

[illegible]

		cov	pid	15921		0	16000
1	Tc06v2_g015770	100.0%	100.0%	-----TTGAAATGCTTTCAAGAGACATTCGGAACAACGAGAAGGCACCTACAGCTCCAGGATCTTTCAAGAAG-----G			
2	Tc03v2_g015240	35.1%	10.7%	-----			
3	Tc01v2_g005660	57.1%	16.0%	-----			
4	Tc01v2_g005640	32.8%	11.1%	-----			
5	Tc01v2_g005650	30.2%	11.1%	-----			
6	Tc01v2_g005680	56.2%	14.7%	-----			
7	Tc01v2_g005670	90.9%	20.7%	-----ATAAAAATCATAATAGAGA--G-----TGAAAGCTTTGATTTTAAATCTCAAAGAAATTTATTGAATTATCAAT			
8	Tc06v2_g000390	31.1%	8.4%	-----			
9	Tc10v2_g005100	31.2%	9.8%	-----			
10	Tc09v2_g027860	38.7%	10.7%	-----			
11	Tc02v2_g006430	33.4%	9.7%	-----			
12	Tc07v2_g006250	36.1%	10.4%	-----			
13	Tc10v2_g004300	32.0%	10.2%	-----			
14	Tc02v2_g028090	56.9%	16.7%	-----			
15	Tc04v2_g008400	39.5%	12.6%	-----			
16	Tc04v2_g012010	36.3%	10.7%	-----			
17	Tc04v2_g024750	34.0%	12.2%	-----			
18	Tc05v2_g023300	33.1%	11.4%	-----			
19	Tc02v2_g028060	24.2%	10.4%	-----			
20	Tc04v2_g008380	38.3%	12.1%	-----			
21	Tc04v2_g008390	34.1%	11.2%	-----			
22	Tc04v2_g008510	31.1%	11.4%	-----			
23	Tc04v2_g008520	25.3%	10.2%	-----			
24	Tc04v2_g008450	30.4%	11.1%	-----			
25	Tc04v2_g008460	22.8%	9.6%	-----			
26	Tc04v2_g008480	39.0%	13.1%	-----			
27	Tc04v2_g008410	35.1%	11.4%	-----			
28	Tc02v2_g023400	1.2%	0.1%	-----			
29	Tc05v2_g004680	4.5%	0.6%	-----			
30	Tc01v2_g018740	42.1%	5.4%	TTTGATGTGGAAAGCATGAGAAAA-GCAGCCTTAATAGCCGTAAGGTCTGTAGAAAGAGATGCATCCCGGAGACCA---A			
31	Tc09v2_g027850	0.0%	0.0%	-----			
32	Tc06v2_g008420	83.2%	10.4%	TTTCGATGTCAATGCTGCCTGGAAA-GTGGTGGACATAGCCATGTCATGTGCACAAACAGCTTCAATTCAAAGGCCT---G			
33	Tc06v2_g008450	84.6%	6.5%	TTTCGATGTCAATGCTGCCTGGAAA-GTGGTGGACATAGCCATGTCATGTGCACAAACAGCTTCAATTCAAAGGCCT---G			
34	Tc06v2_g008430	84.7%	11.6%	TTTCGATGTCAATGCTGCCTGGAAA-GTGGTGGACATAGCCATGTCATGTGCACAAACAGCTTCAATTCAAAGGCCT---G			
35	Tc06v2_g008510	45.3%	8.2%	TTTGAAATAAATTTCTGTATGGAAA-GCAATAGAAAGTGGCAATGGCTTGCTTATCTCTTGCCCTCCACGAAAGGCCA---A			
36	Tc06v2_g008560	41.6%	6.8%	TTTGCACTCAATCTGTGAGAAAA-GCTTTAGAGATAGCAATGGCTTGCAATTTCTGCAGCTGGGACTGGAAGGCTA---A			
37	Tc09v2_g008300	53.6%	8.4%	TTTGATGTGAATTCCTGTCTGGAAA-GCTTTGGACGTGGCAATGGCAAGCACTACACCAAGTCCGTTTCATAGAGCT---G			
38	Tc06v2_g008480	47.5%	8.5%	TATGACATTAAATCTGTATGGAAA-GCTGTGGACTTAGCAATGACTTGTGTATCAAGCAATCCCGAAGCTAGACCT---A			
	consensus/100%						
	consensus/90%						
	consensus/80%						
	consensus/70%						

		cov	pid	16001		16080
1	Tc06v2_g015770	100.0%	100.0%	GGAGGCATCTTCAAGTACCAAGTCAATCCAATCATCTGCTGAATCCACCAGCTACCAGATGAGTTC---TGTTCCGTGC		
2	Tc03v2_g015240	35.1%	10.7%	-----		
3	Tc01v2_g005660	57.1%	16.0%	-----		
4	Tc01v2_g005640	32.8%	11.1%	-----		
5	Tc01v2_g005650	30.2%	11.1%	-----		
6	Tc01v2_g005680	56.2%	14.7%	-----		
7	Tc01v2_g005670	90.9%	20.7%	AAAGATTCAATTGAATTAGAACTTCACT---CACCTATGCAGAGATGGAATAACT---ATAATG---CTTTCGTGG		
8	Tc06v2_g000390	31.1%	8.4%	-----		
9	Tc10v2_g005100	31.2%	9.8%	-----		
10	Tc09v2_g027860	38.7%	10.7%	-----		
11	Tc02v2_g006430	33.4%	9.7%	-----		
12	Tc07v2_g006250	36.1%	10.4%	-----		
13	Tc10v2_g004300	32.0%	10.2%	-----		
14	Tc02v2_g028090	56.9%	16.7%	-----		
15	Tc04v2_g008400	39.5%	12.6%	-----		
16	Tc04v2_g012010	36.3%	10.7%	-----		
17	Tc04v2_g024750	34.0%	12.2%	-----		
18	Tc05v2_g023300	33.1%	11.4%	-----		
19	Tc02v2_g028060	24.2%	10.4%	-----		
20	Tc04v2_g008380	38.3%	12.1%	-----		
21	Tc04v2_g008390	34.1%	11.2%	-----		
22	Tc04v2_g008510	31.1%	11.4%	-----		
23	Tc04v2_g008520	25.3%	10.2%	-----		
24	Tc04v2_g008450	30.4%	11.1%	-----		
25	Tc04v2_g008460	22.8%	9.6%	-----		
26	Tc04v2_g008480	39.0%	13.1%	-----		
27	Tc04v2_g008410	35.1%	11.4%	-----		
28	Tc02v2_g023400	1.2%	0.1%	-----		
29	Tc05v2_g004680	4.5%	0.6%	-----		
30	Tc01v2_g018740	42.1%	5.4%	CTATTGCAGAGGTATTGGCAGAGCTGAAAGAACGCTATAGTATTGAGCTCTCGTACCTTGACGCTTTGGGACACTCAGG-		
31	Tc09v2_g027850	0.0%	0.0%	-----		
32	Tc06v2_g008420	83.2%	10.4%	ACATGAGTCTTGTATTAAACAGAACTGAAGGAATGCATGGCTATAGAGATGGCTCACGGAAGAATCAAAGAGTGCTAAGC		
33	Tc06v2_g008450	84.6%	6.5%	ACATGAGTCTTGTATTAAACAGAACTGAAGGAATGCATGGCTATAGAGATGGCTCACGGAAGAATCAAAGAGTGCTAAGC		
34	Tc06v2_g008430	84.7%	11.6%	ACATGAGTCTTGTATTAACTGAACCTGAAGGAATGCATGGCTATAGAGATGGCTCTCGGAGAACTGAAAGAACTGACAGC		
35	Tc06v2_g008510	45.3%	8.2%	CTATGAATTATGTGGTAACGGAATTAAAGCAGCTGTTTGTAGCCGAGATAAAGAGGACAGAGGAGTCAACGAAGT---		
36	Tc06v2_g008560	41.6%	6.8%	CCATGGATGTGGTAGCAATGGAATTGAATCAGTGTTTACAGTTGAGATTGCTCAAAACAAAAGGACCATGAAAGC---		
37	Tc09v2_g008300	53.6%	8.4%	CAATGAGCTCCGTGTTAACAGAGCTAAAAAGTGCTGGACATGGAGTTGCTCACAATAGGGAAAGAACGCAAGGGTTTC		
38	Tc06v2_g008480	47.5%	8.5%	ATATGAGCAGTACAGTGATGGATCTGAAAGTGTGTCGAAATGCAGATGCATGGTCCAAGAAAGCAGGAGTCA-----		
	consensus/100%					
	consensus/90%					
	consensus/80%					
	consensus/70%					

Figura 22. Alinhamento dos genes identificados na família gênica do *DRR206*. Sendo destacado o gene o gene selecionado para este trabalho e o respectivo local onde foi desenhado o par de *primer*.

		cov	pid	3681	.	.	.	.	.	.	:	.	3760
1	Tc02v2_g022270	100.0%	100.0%		-----								
2	Tc03v2_g001160	80.3%	35.2%		-----								
3	Tc04v2_g001170	81.7%	36.1%		-----								
4	Tc06v2_g004720	0.0%	0.0%		CAAAAT-----TAAAAATATAAAGACTTAATTGAACACAATAAAAGAA-----TAAAGATTATTGTG-----AA								
5	Tc02v2_g022260	14.8%	3.3%		-----								
6	Tc04v2_g001160	0.0%	0.0%		CCAGGAA--AATCTCAAATGTTCAATCTACATAGACCTCAGGATTGTAATTATCAATGCCTCTAATTGAATCTC----								
7	Tc06v2_g017360	0.0%	0.0%		-----								
8	Tc06v2_g017370	35.9%	5.7%		-----								
9	Tc06v2_g017380	0.7%	0.2%		-----								
10	Tc06v2_g017470	34.5%	7.2%		TCTATCGTAGAGAACAGCTGCGAAATCTTACCAAAGG-GCAGC-----								
11	Tc06v2_g017350	30.8%	14.6%		-----								
12	Tc06v2_g017340	33.0%	15.5%		-----								
13	Tc06v2_g017420	67.0%	5.9%		GTCAATAAAAAAAAAAGAGATAATAAATTTTAACTAAAGTAAATTTAATTGCGCAAGTAAAGATTGAAGATATTGAG								
14	Tc06v2_g017400	36.1%	6.1%		-----								
15	Tc04v2_g021050	33.0%	11.5%		-----								
16	Tc06v2_g017290	75.0%	5.8%		-----								
17	Tc06v2_g017320	0.0%	0.0%		-----								
18	Tc06v2_g017250	35.5%	5.6%		-----								
19	Tc10v2_g012610	0.0%	0.0%		-----								
20	Tc06v2_g017440	0.0%	0.0%		-----								
21	Tc06v2_g017330	0.0%	0.0%		-----								
	consensus/100%												
	consensus/90%												
	consensus/80%												
	consensus/70%												

		cov	pid	3761	.	.	.	8	.	.	.	.	3840
1	Tc02v2_g022270	100.0%	100.0%		-----								
2	Tc03v2_g001160	80.3%	35.2%		-----								
3	Tc04v2_g001170	81.7%	36.1%		-----								
4	Tc06v2_g004720	0.0%	0.0%		TTTTCTGAATAGTTAATGAATTT-TTTTAAACTTTA--TGCTTAATAACAACAAATACAAAAAATCATTATCAAAAC								
5	Tc02v2_g022260	14.8%	3.3%		-----								
6	Tc04v2_g001160	0.0%	0.0%		-----								
7	Tc06v2_g017360	0.0%	0.0%		-----								
8	Tc06v2_g017370	35.9%	5.7%		-----								
9	Tc06v2_g017380	0.7%	0.2%		-----								
10	Tc06v2_g017470	34.5%	7.2%		-----CTTCAATCTCTCAAAATAATATGTATGCTGCTGGAGGA-----G--AACCA-TATACAGCAGATC								
11	Tc06v2_g017350	30.8%	14.6%		-----								
12	Tc06v2_g017340	33.0%	15.5%		-----								
13	Tc06v2_g017420	67.0%	5.9%		ATATATAAATAAGTAATACAATTAGTAAGTAAATTTAATTTTATGTAGTTAAATAGATAAAAT-TATTAAATTAATT								
14	Tc06v2_g017400	36.1%	6.1%		-----								
15	Tc04v2_g021050	33.0%	11.5%		-----								
16	Tc06v2_g017290	75.0%	5.8%		-----								
17	Tc06v2_g017320	0.0%	0.0%		-----								
18	Tc06v2_g017250	35.5%	5.6%		-----								
19	Tc10v2_g012610	0.0%	0.0%		-----								
20	Tc06v2_g017440	0.0%	0.0%		-----								
21	Tc06v2_g017330	0.0%	0.0%		-----								
	consensus/100%												
	consensus/90%												
	consensus/80%												
	consensus/70%												

		cov	pid	3841	:	.	.	.	.	9	.	.	3920
1	Tc02v2_g022270	100.0%	100.0%		-----								
2	Tc03v2_g001160	80.3%	35.2%		-----								
3	Tc04v2_g001170	81.7%	36.1%		-----								
4	Tc06v2_g004720	0.0%	0.0%		AAATTTGTAATTAACAAATAATTAAGAGTAACATAATTTCTATGCTTAACCTACATTAAATAAATGTG----ATGATCA								
5	Tc02v2_g022260	14.8%	3.3%		-----								
6	Tc04v2_g001160	0.0%	0.0%		-----								
7	Tc06v2_g017360	0.0%	0.0%		-----								
8	Tc06v2_g017370	35.9%	5.7%		-----								
9	Tc06v2_g017380	0.7%	0.2%		-----								
10	Tc06v2_g017470	34.5%	7.2%		ACACC-----CTGTATG-CTATGGTGCACTGCACC--CGAGACTTATCCCAGATGACTGTAACGAATGCCTTGAGG								
11	Tc06v2_g017350	30.8%	14.6%		-----								
12	Tc06v2_g017340	33.0%	15.5%		-----								
13	Tc06v2_g017420	67.0%	5.9%		AAAATTATATTTTCTGAC-CCATAGGGCTGGCCTGC--CTA--ACCCACTCCAGCCCACTGATATGATGGGCTGGCCC								
14	Tc06v2_g017400	36.1%	6.1%		-----								
15	Tc04v2_g021050	33.0%	11.5%		-----								
16	Tc06v2_g017290	75.0%	5.8%		-----								
17	Tc06v2_g017320	0.0%	0.0%		-----								
18	Tc06v2_g017250	35.5%	5.6%		-----								
19	Tc10v2_g012610	0.0%	0.0%		-----								
20	Tc06v2_g017440	0.0%	0.0%		-----								
21	Tc06v2_g017330	0.0%	0.0%		-----								
	consensus/100%												
	consensus/90%												
	consensus/80%												
	consensus/70%												

Figura 23. Alinhamento dos genes identificados na família gênica do *CRK*. Sendo destacado o gene o gene selecionado para este trabalho e o respectivo local onde foi desenhado o par de *primer*.

81	Tc02v2_g030930	30.9%	8.2%		
82	Tc04v2_g011260	27.1%	9.1%		
83	Tc08v2_g007140	81.0%	8.7%	AAGAAAAGCAAGAGAGAGAGACAAAGAGAGAAGAGG-ATGAAAACATATGAACGACAGTAGCAATGGCAGCAATAATAACT	
84	Tc01v2_g006740	82.2%	9.0%	--TGCTAGGTGGGAAATAAGCATAGTAAGAAGATG-AAGTCCATGAGTAATGATGATAACAACAATAACAATACTAACT	
85	Tc10v2_g006860	29.7%	5.4%		
86	Tc10v2_g001150	21.5%	3.9%		
87	Tc10v2_g006970	51.6%	8.0%		
88	Tc05v2_g000590	52.5%	7.1%		
89	Tc05v2_g013630	44.4%	8.9%		
90	Tc05v2_g022180	39.7%	10.2%		
91	Tc08v2_g002910	50.1%	8.0%		
92	Tc01v2_g005290	80.8%	11.5%	TATACAAAG----AGAAACAAAGAGGGAGTTTTT--AGCTCTCTCAAAATTC-TCTGGCTT-----AGATGGTGTTC	
93	Tc09v2_g028270	83.3%	10.6%	GGTGGGGAT---AAGAAACGCTGACCGATGATTTT--GGT---TTCGA--AGC-TGAGAAGT-----TGATTGTTTAT	
94	Tc10v2_g005400	80.4%	11.7%	GATCGAGGG---AAA--AGG-----TTCAGTTT-----TGG-----	
95	Tc05v2_g004650	77.0%	11.2%	TC--CAAAG---TAGAAAAACATACAGACACAC--ACA-----TCC-----CCCTTATCTCT	
96	Tc09v2_g014850	86.2%	11.6%		
97	Tc04v2_g007430	37.3%	12.5%		
98	Tc03v2_g017880	36.8%	13.0%		
99	Tc01v2_g030940	24.3%	10.0%		
100	Tc09v2_g017400	37.2%	10.9%	TT--CTC-----ATCTGGAGGAA--ATG-----GCT-----TGCATGTCCCT	
101	Tc05v2_g020760	35.4%	10.5%	GA--CAA-----ACGCAAGAAAAC--ACA-----ACA-----TAATGAACCTT	
102	Tc06v2_g003080	43.1%	16.7%		
103	Tc09v2_g001630	47.3%	16.2%		
104	Tc09v2_g002240	55.1%	18.3%		
105	Tc09v2_g010920	52.3%	19.5%		
106	Tc06v2_g001850	61.1%	16.9%		
107	Tc06v2_g015090	50.3%	16.9%		
108	Tc08v2_g015040	68.0%	13.2%		
109	Tc02v2_g014960	77.6%	14.2%	AT--TAAAT---CAGTAACACATAGCAAAGCCAAA--GAA-----GA-----TG-----GGAGT	
110	Tc06v2_g015070	47.2%	20.1%		
111	Tc02v2_g015570	39.8%	20.6%		
112	Tc01v2_g029120	59.4%	18.2%		
113	Tc04v2_g023020	50.0%	17.4%		
114	Tc02v2_g022690	52.1%	18.4%		
115	Tc04v2_g004280	37.1%	23.8%		
	consensus/100%				
	consensus/90%				
	consensus/80%				
	consensus/70%				
	cov	pid	1201	:	1280
1	Tc03v2_g024410	100.0%	100.0%		
2	Tc03v2_g015920	94.0%	42.5%		CGGTATTATAATCAG
3	Tc07v2_g011970	32.3%	34.9%		
4	Tc04v2_g016540	66.8%	26.3%		
5	Tc03v2_g024800	74.0%	28.4%		
6	Tc03v2_g009340	33.6%	13.4%		TATTCCACAATATCATAGCAGTTCCTCCTCAGTTTTGCTCA
7	Tc02v2_g029230	77.1%	17.4%		TGTA-CTCATTTTACCATTCTTTCTAATCATTTTTTCAGTCATATTAGAT
8	Tc04v2_g023850	73.3%	25.3%		
9	Tc01v2_g010090	80.5%	23.2%		
10	Tc07v2_g007820	42.8%	27.8%		
11	Tc02v2_g008150	60.4%	26.5%		
12	Tc02v2_g016070	37.9%	26.0%		
13	Tc07v2_g002530	69.5%	26.7%		
14	Tc08v2_g016440	20.3%	30.2%		
15	Tc10v2_g006840	42.2%	22.9%		
16	Tc03v2_g011610	79.5%	21.9%		
17	Tc05v2_g007130	26.5%	20.6%		
18	Tc08v2_g000250	58.7%	24.2%		
19	Tc01v2_g025510	66.6%	23.7%		
20	Tc01v2_g025460	52.2%	24.5%		
21	Tc02v2_g016330	90.2%	16.1%	CTTAGTTTCACACCATCGTCGGTGC-CCTTATC-ACAATCTCGGTGAAAGAAGAGCCTGACCCCTCCTCAACCTGTTCAA	
22	Tc08v2_g009280	78.4%	20.2%		
23	Tc06v2_g014630	37.5%	24.6%		
24	Tc03v2_g012360	59.6%	20.6%		
25	Tc06v2_g002900	41.7%	24.8%		
26	Tc01v2_g033220	37.5%	25.3%		
27	Tc01v2_g033230	45.2%	21.6%		
28	Tc03v2_g020360	55.0%	24.9%		
29	Tc01v2_g033200	34.7%	25.4%		
30	Tc01v2_g033210	47.2%	26.0%		
31	Tc04v2_g020700	44.2%	24.3%		
32	Tc01v2_g021580	40.6%	26.7%		
33	Tc01v2_g021590	45.5%	23.0%		
34	Tc05v2_g022810	40.2%	24.5%		
35	Tc01v2_g004800	42.4%	19.5%		
36	Tc06v2_g014640	44.5%	17.3%		
37	Tc03v2_g012350	60.1%	23.3%		
38	Tc03v2_g012340	52.8%	22.2%		
39	Tc06v2_g010530	89.5%	18.7%	TCGGGTA--AAAGGTACTCGAAGC-CCGTGAT-CGATTTGGATGATGACTTCGAGGCTGACTTTCAGGAGT---TAAAG	
40	Tc03v2_g020400	62.6%	24.8%		

Figura 24_continuação. Alinhamento dos genes identificados na família gênica do *RAP2*. Sendo destacado o gene o gene selecionado para este trabalho e o respectivo local onde foi desenhado o par de *primer*.

41	Tc04v2_g020690	31.0%	27.0%	-----
42	Tc01v2_g021610	24.9%	30.3%	-----
43	Tc04v2_g020680	38.4%	22.8%	-----
44	Tc01v2_g021620	29.7%	28.9%	-----
45	Tc06v2_g003810	64.5%	8.2%	TGTCATTTTCAAGAACTACTTGCATATTTCTTTCTTTGCCTGCATTAGATTATGGTATTATTATTGAAGGGATTAA
46	Tc09v2_g006410	32.7%	5.7%	AATTCCTTCCGCCAC---CGAGGC-----CACGTT-TGGGCGAAACCTACA-----GCCAGGCAACTATTCAT
47	Tc08v2_g014040	24.2%	11.8%	-----
48	Tc01v2_g008980	34.0%	5.2%	TGGTTTTTATCATACTGTTTGCCTGTTCATTGTTTGGTTAAGAAACAGG-----TTGTTTCAAGTTTTAAC
49	Tc01v2_g005320	32.1%	6.3%	-----
50	Tc09v2_g006400	27.0%	13.1%	-----
51	Tc09v2_g005780	25.2%	10.8%	-----
52	Tc10v2_g010450	71.9%	8.4%	ATAATGATAACCCAAAC---TTCATTTTCTTCATTACTT---TCAACAATTAAGCTTAATTAACCAAAACAATAAT
53	Tc03v2_g002470	48.7%	8.9%	CTGCTTCTTCAGCAGCACCCTTCCATGCAATCTCTTCTC---TTCACCGTAATGCCAATCTAGTTACTTCGATTTT
54	Tc09v2_g030660	55.2%	11.2%	-----CCTCGCTCTTTC---CTTAGCCTCTCTTGCTCTACTTTAAATTATTAAAC
55	Tc02v2_g030500	58.4%	9.9%	CGAAGAGTTGAGGGAGG-----CTGATTAGTGGAATTTATGTCGGGTGA
56	Tc08v2_g010320	43.7%	10.2%	-----
57	Tc03v2_g014010	43.5%	11.1%	-----
58	Tc03v2_g022630	36.6%	11.4%	-----
59	Tc05v2_g022800	46.1%	9.6%	AGATAGATTGAAAATTCGTCTGAC-----CTGGCCGC---CATGGCCCATCTGCTAATTTGACTCACGTGTAAC
60	Tc04v2_g004130	51.9%	8.9%	CCATGGCTGCAGCATCAGCCTTTGCACATCATCAGTCTC---AACACCCAAAGTGATATCTTGCTCACCAGCAAGCA
61	Tc08v2_g014220	47.5%	10.0%	-----TAAG
62	Tc08v2_g014230	29.3%	9.1%	-----
63	Tc01v2_g028550	35.8%	8.9%	-----
64	Tc03v2_g020620	49.1%	11.9%	-----
65	Tc01v2_g032670	39.6%	10.1%	CATTAGGTAGAGAAATT---TTC-AAGCCTGAA-----TTCACATAGTAGA
66	Tc03v2_g012660	35.1%	9.5%	-----
67	Tc10v2_g010070	27.3%	8.6%	-----
68	Tc06v2_g007900	34.0%	9.1%	-----
69	Tc09v2_g003890	36.2%	8.1%	-----
70	Tc09v2_g008940	53.7%	9.8%	CGACCTCTGGGGTATTCCAGCTCT-CCCTCTGACTCTCTC-----TTAAAAATAAGATGAA
71	Tc03v2_g014000	35.1%	8.9%	-----
72	Tc03v2_g022620	31.4%	7.3%	-----
73	Tc09v2_g024230	41.4%	10.5%	-----
74	Tc05v2_g007150	25.4%	7.7%	-----
75	Tc06v2_g009800	77.0%	9.4%	-----AAGAAA--TGG-GG-ACCTCTT-T-----TGCTTTCTTT---TCCAACGCCTGATTTGTAG
76	Tc05v2_g015680	80.1%	9.6%	-----CAAAATG--TTTGAT-ATTGTA-G-----TCTCTTTTT---TTTTCCCTTGAGATTGGAA
77	Tc09v2_g018940	51.4%	9.5%	-----
78	Tc01v2_g007690	80.3%	8.3%	-----GATATA--T---AC-AAAAATA-A-----CCCCATTTTT---TTTTCTGTTTAAAGTTTGATA
79	Tc09v2_g018300	21.3%	8.9%	-----
80	Tc05v2_g025550	57.7%	12.1%	-----
81	Tc02v2_g030930	30.9%	8.2%	-----
82	Tc04v2_g011260	27.1%	9.1%	CATAGTCAAGCTTCAGC--TGCCGC-ATCTGTA-TCCAATGCTGTTCCAACAAGCTTCTATCTGTCTTCTCACCTCAGTG
83	Tc08v2_g007140	81.0%	8.7%	-----CTGTCTCCGCCGC--TGCTGC-TGGTGT-ACCACAGCAGTTCCATCAAGTTTTTCCACTCTCCATCCCATCTTA
84	Tc01v2_g006740	82.2%	9.0%	-----
85	Tc10v2_g006860	29.7%	5.4%	-----CAAACCGAAC--TAGCCT-TGTTGTT-AACCTGGTGACCCCACTGGAAC-----
86	Tc10v2_g001150	21.5%	3.9%	-----TTGTGG--AAGAGA-TGTGGAT-GGTGAAGGTGAACCAAGTGGG-----
87	Tc10v2_g006970	51.6%	8.0%	-----CAAAAA--GGGGTG-TATGCAA-GGTAAGGAG--GGCCAGAGAA-----
88	Tc05v2_g000590	52.5%	7.1%	-----AAACCA--AACTGC-ACTTCAA-CTCCCTACATATCCCGCGCT-----
89	Tc05v2_g013630	44.4%	8.9%	-----
90	Tc05v2_g022180	39.7%	10.2%	-----CCAAGC--CCACCC-ACCTCAT-CGTACTTGGGAACCCCACTGAT-----
91	Tc08v2_g002910	50.1%	8.0%	GAGAGTAAGAAAAA---TGTGGG-ATCTTAACGACTCTCTGATCAGCCAAGGGA-----CGATGAA
92	Tc01v2_g005290	80.8%	11.5%	AAGAAATTAAGACGAAA--TGCTAG-ATCTTAACCTCAATGCCGCTGCTGAGTGC-----GACTCAG
93	Tc09v2_g028270	83.3%	10.6%	TAAAGAAAGGAAAAACA--TGTTGG-ATCTTAACCTTGATTTGTCTCATGTGAGTC-----ATCTTGT
94	Tc10v2_g005400	80.4%	11.7%	TTGGGACTTAGTTATGA--TGCTGG-ATCTTAACCTGAGTGTATTTTCGGGTGGTGA-----TGATTCA
95	Tc05v2_g004650	77.0%	11.2%	ATGAGCATGGGGAACAT--GGATTCTTCTTCCACTCAAAATGGCTTGCTTTCTCT-----CTTTCCA
96	Tc09v2_g014850	86.2%	11.6%	-----
97	Tc04v2_g007430	37.3%	12.5%	-----
98	Tc03v2_g017880	36.8%	13.0%	-----
99	Tc01v2_g030940	24.3%	10.0%	-----
100	Tc09v2_g017400	37.2%	10.9%	CTCAACATTGAGAAATC---AGTCA-CACTAA---AA--TGTGGAACAAATCTAG-----CTGACAG
101	Tc05v2_g020760	35.4%	10.5%	TTGATTATAGAAAATC---AGACC-TCCTTTCAACATATAAATCCCATTTGTCCA-----TTGACAA
102	Tc06v2_g003080	43.1%	16.7%	-----
103	Tc09v2_g001630	47.3%	16.2%	-----
104	Tc09v2_g002240	55.1%	18.3%	-----
105	Tc09v2_g010920	52.3%	19.5%	-----
106	Tc06v2_g001850	61.1%	16.9%	-----
107	Tc06v2_g015090	50.3%	16.9%	-----
108	Tc08v2_g015040	68.0%	13.2%	CTCAGAAAGG--TACT-----
109	Tc02v2_g014960	77.6%	14.2%	GGCAGCTGGGGTCCAG--GAAAA-ACCACC-----
110	Tc06v2_g015070	47.2%	20.1%	-----
111	Tc02v2_g015570	39.8%	20.6%	-----
112	Tc01v2_g029120	59.4%	18.2%	-----
113	Tc04v2_g023020	50.0%	17.4%	-----
114	Tc02v2_g022690	52.1%	18.4%	-----
115	Tc04v2_g004280	37.1%	23.8%	-----
	consensus/100%			
	consensus/90%			
	consensus/80%			
	consensus/70%			

Figura 24_continuação. Alinhamento dos genes identificados na família gênica do *RAP2*. Sendo destacado o gene o gene selecionado para este trabalho e o respectivo local onde foi desenhado o par de *primer*.

Observou-se que os seis pares de *primers* foram desenhados em regiões favoráveis e pouco conservadas (Figuras 19 a 24), para que quando utilizados nas reações de RT-qPCR não ocorram amplificações de fragmentos inespecíficos, visto que alguns dos genes estudados pertencem a famílias gênicas compostas por uma grande quantidade de membros.

Para verificar a especificidade dos *primers*, *in silico*, foi realizado ainda, para cada par de *primer*, um *PrimerBlaster* na segunda versão do genoma do cacau (Figura 19). Observou-se, mediante essa análise, que os *primers* são específicos para os genes em estudo. Para os genes *LRR-STK* e *RAP2* foi identificada a presença de uma isoforma. Importante ressaltar que todos os *primers* foram desenhados nas respectivas sequências transcricionais de cada gene, desprezando assim a presença de íntrons remanescentes. Importante ressaltar que como os *primers* para genes *GAPDH* e *MDH* pegam em junções éxon-éxon poderão ser utilizados para verificar possíveis contaminações com DNA genômico.

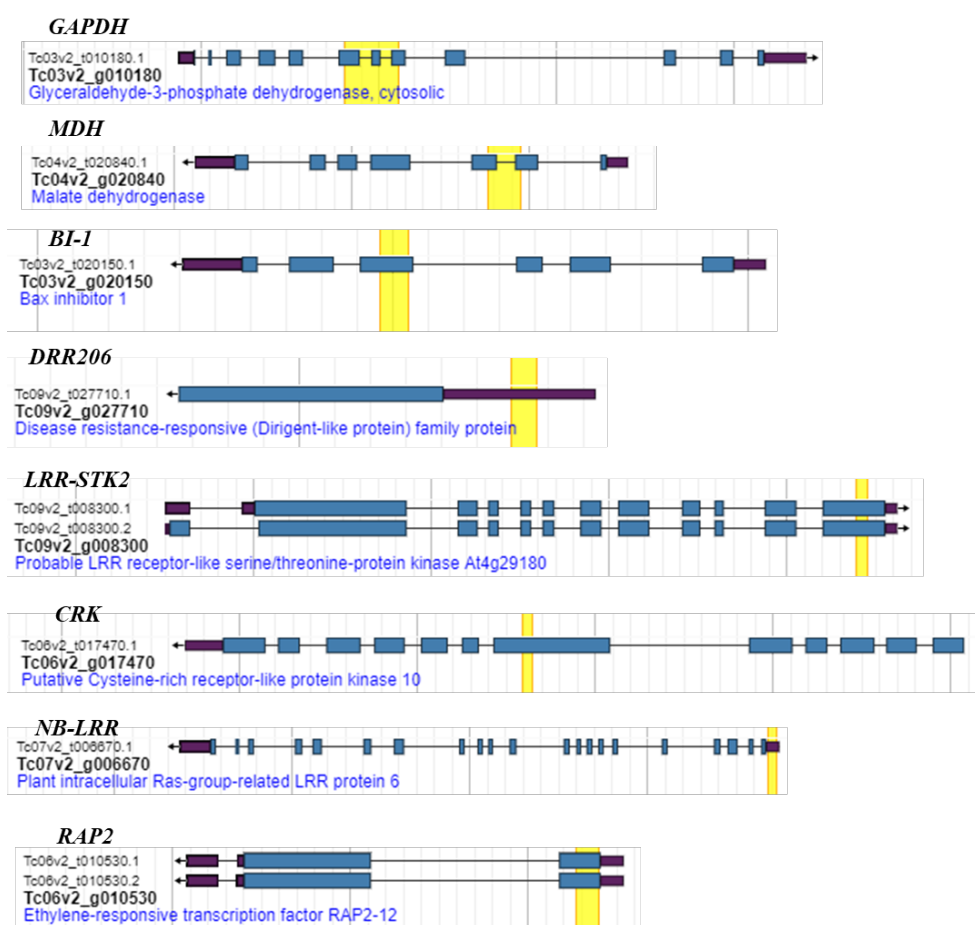


Figura 25. *PrimerBlaster* no genoma para verificação da especificidade dos *primers* GAPDH, MDH, BI-1, DRR206, LRR-STK2, CRK, NB-LRR e RAP2, sendo destacado na cor amarela os locais, em cada gene, onde foram desenhados.

5.7. Extração do RNA total

Iniciando as etapas *in vitro*, foram obtidos os RNAs totais dos 24 tratamentos, sendo suas respectivas concentrações e razões de absorbância 260/280 verificadas mediante quantificação no NanoDrop2000 (Thermo Scientific), apresentadas na tabela 8.

Tabela 8. Concentrações, em ng/μl, do RNA total e absorbância 260/280 para os 24 tratamentos.

Tratamento	ng/μl	260/280	Tratamento	ng/μl	260/280	Tratamento	(ng/μl)	260/280
CCN51-I-4hai	22,6	1,91	CCN51-I-48hai	103,8	2,11	CCN51-I-7dai	198,6	2,09
CCN51-NI-4hai	12,6	1,73	CCN51-NI-48hai	132,9	2,07	CCN51-NI-7dai	53,0	1,85
TSH1188-I-4hai	22,3	2,03	TSH1188-I-48hai	26,1	1,73	TSH1188-I-7dai	127,3	2,14
TSH1188-NI-4hai	37,0	1,98	TSH1188-NI-48hai	58,7	2,03	TSH1188-NI-7dai	57,1	2,06
CCN51-I-24hai	37,3	2,06	CCN51-I-72hai	19,4	2,18	CCN51-I-15dai	179,2	2,09
CCN51-NI-24hai	43,7	2,03	CCN51-NI-72hai	28,5	1,88	CCN51-NI-15dai	95,9	2,06
TSH1188-I-24hai	15,5	1,93	TSH1188-I-72hai	51,8	2,08	TSH1188-I-15dai	61,2	2,08
TSH1188-NI-24hai	32,8	1,99	TSH1188-NI-72hai	44,0	1,85	TSH1188-NI-15hai	192,2	2,10

A maioria das concentrações obtidas foram superiores a 37 ng/μl, sendo algumas destas acima dos 100 ng/μl. Esses valores obtidos são relativamente altos, visto as dificuldades em se extrair RNA, sobretudo de tecido lenhoso, o qual apresenta elevadas quantidades de fibras e células mortas. Observou-se ainda que a razão 260/280 para RNA totais extraídos dos 24 tratamentos situou-se em torno de 2,00, o que segundo o boletim técnico do fabricante (Thermo Scientific) do espectrofotômetro utilizado razões de absorbância 260/280 situadas nessa faixa é aceito como RNA “puro”.

Posteriormente, para verificação da integridade, foram separadas alíquotas de 10 μl de cada amostra, sendo estas submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, onde foram checados suas integridades e possíveis contaminações com DNA genômico (Figura 26).

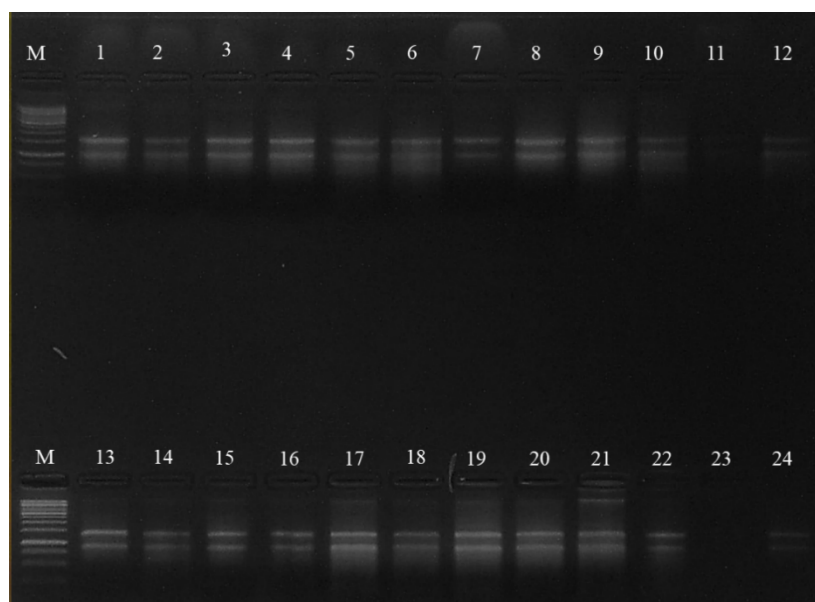


Figura 26. Eletroforese para as 24 amostras de RNA total. Sendo: Marcador (M), CCN51-I (inoculado)-4 (horas após a inoculação) hai (1), CCN51-NI (não inoculado)-4hai (2), TSH1188-I-4hai (3), TSH1188-NI-4hai (4), CCN51-I-24hai (5), CCN51-NI-24hai (6), TSH1188-I-24hai (7), TSH1188-NI-24hai (8), CCN51-I-48hai (9), CCN51-NI-48hai (10), TSH1188-I-48hai (11), TSH1188-NI-48hai (12), CCN51-I-72hai (13), CCN51-NI-72hai (14), TSH1188-I-72hai (15), TSH1188-NI-72hai (16), CCN51-I-7 (dias após a inoculação) dai (17), CCN51-NI-7dai (18), TSH1188-I-7dai (19), TSH1188-NI-7dai (20), CCN51-I-15dai (21), CCN51-NI-15dai (22), TSH1188-I-15dai (23) e TSH1188-NI-15hai (24).

Analisando a imagem proveniente do gel, os RNAs totais obtidos demonstraram boa integridade e com ausência de contaminação em praticamente todas as amostras, ressaltando que posteriormente as 24 amostras foram submetidas à tratamento com DNase para eliminação de possíveis vestígios de DNA genômico.

Após tratamento e síntese do cDNA, foram iniciadas as reações de RT-qPCR e analisados os *primers* quanto a sua eficiência e especificidade.

5.8. Especificidade dos *primers*

Para verificação de possíveis amplificações inespecíficas e/ou formação de dímeros, foram geradas, ao fim de cada reação de RT-qPCR, curvas de dissociação dos *amplicons* gerados por cada *primer* (Figura 27).

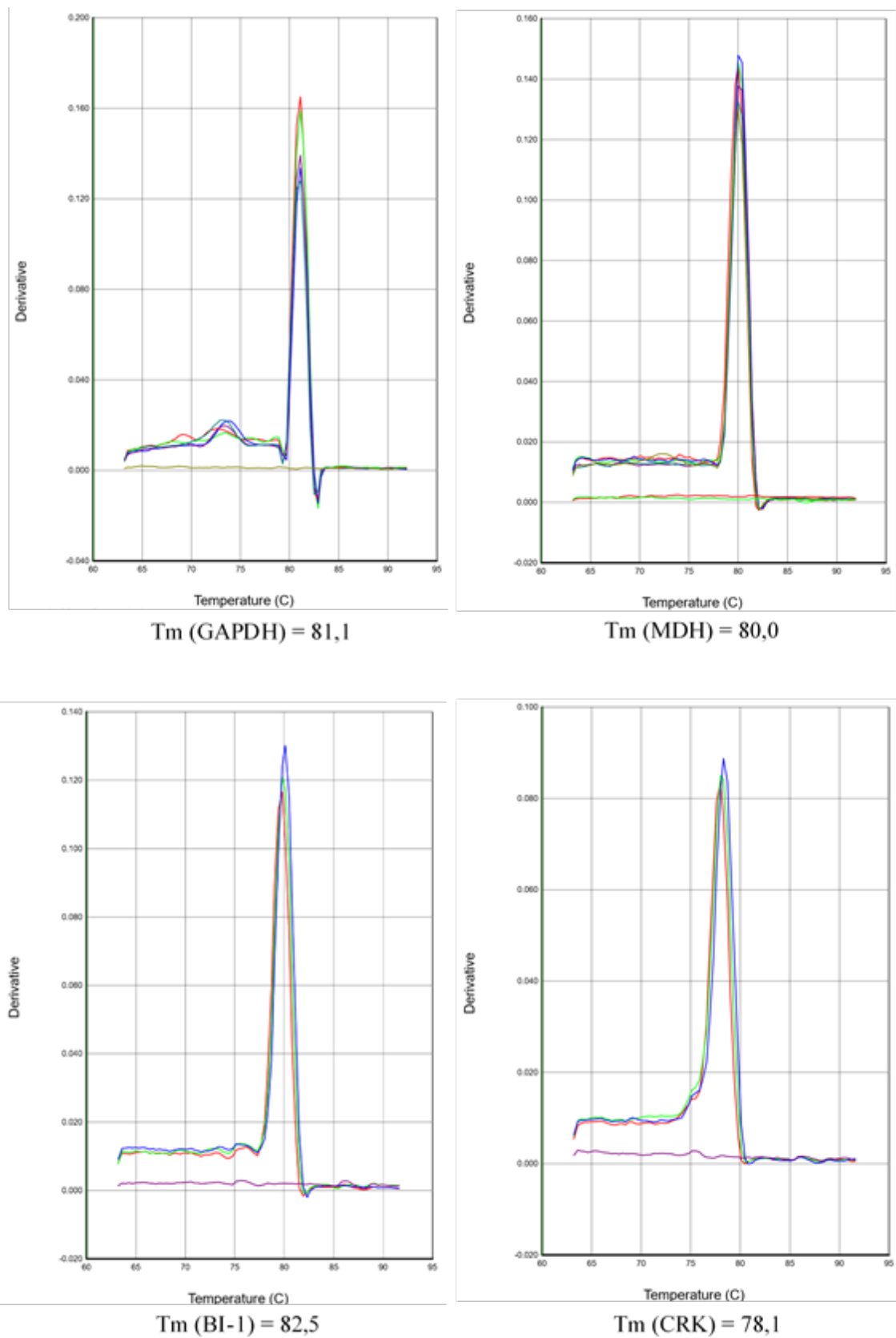
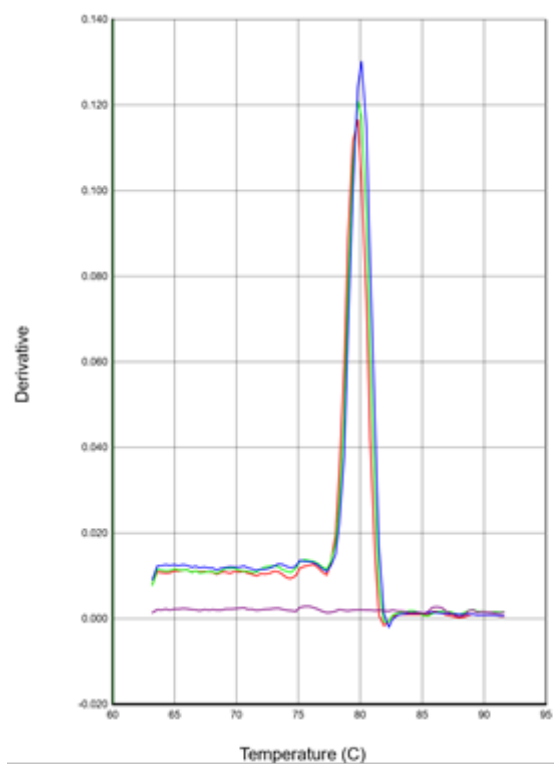
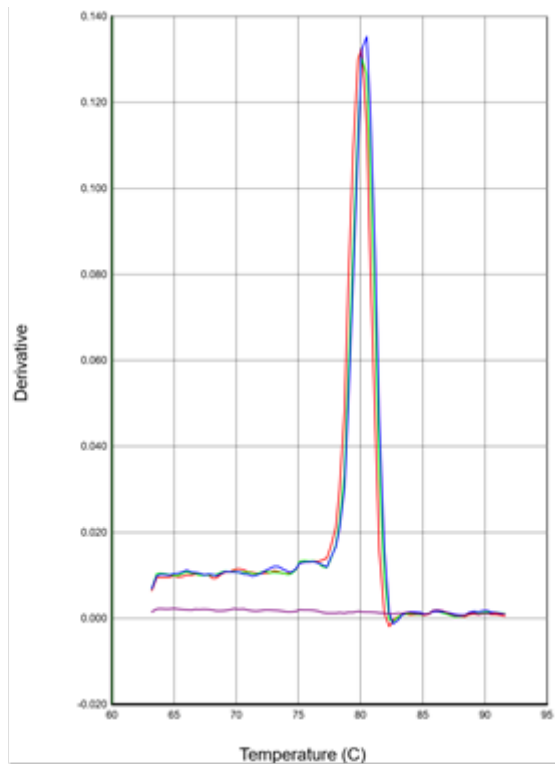


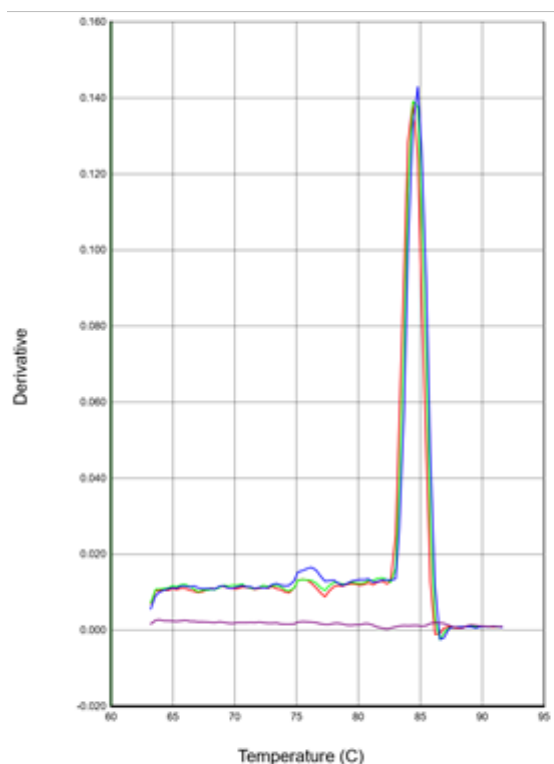
Figura 27. T_m e curvas de dissociação dos *amplicons* gerados pelos pares de *primers* utilizados: GAPDH, MDH, BI-1, CRK, DRR206, LRR-STK2, RAP2 e NB-LRR.



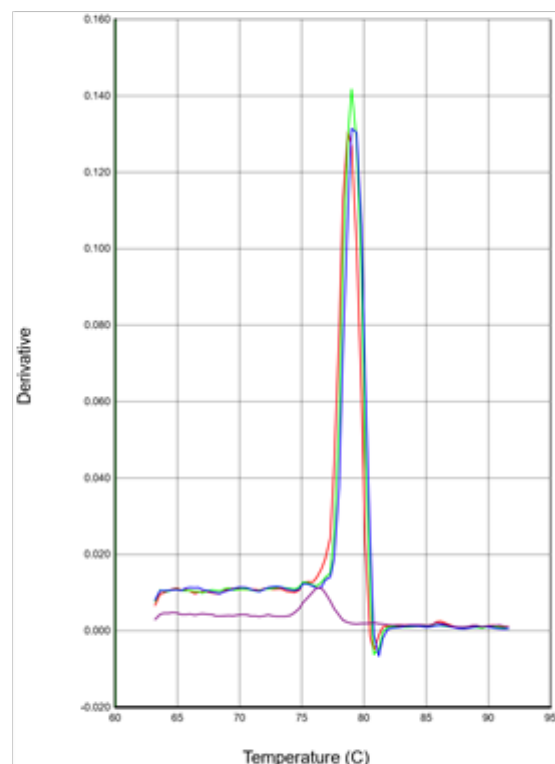
T_m (DRR206) = 79,9



T_m (LRR-STK2) = 80,2



T_m (RAP2) = 84,5



T_m (NB-LRR) = 78,9

Figura 27_continuação. T_m e curvas de dissociação dos *amplicons* gerados pelos pares de *primers* utilizados: GAPDH, MDH, BI-1, CRK, DRR206, LRR-STK2, RAP2 e NB-LRR.

Observou-se que as curvas de dissociação originadas dos fragmentos amplificados por cada par de *primer* formaram picos bem definidos, com ausências de ruídos e sem possíveis dimerizações de *primers*. As T_m obtidas variaram de 78,1 °C (CRK) até 84,5 °C (RAP2), estando todas de acordo com os valores preditos *in silico*. Afim de verificar a especificidade dos *primers*, os produtos da RT-qPCR, provenientes de um *pool* das 24 amostras de cDNA em estudo, foram analisados em eletroforese em gel a 1,5% (Figura 28).

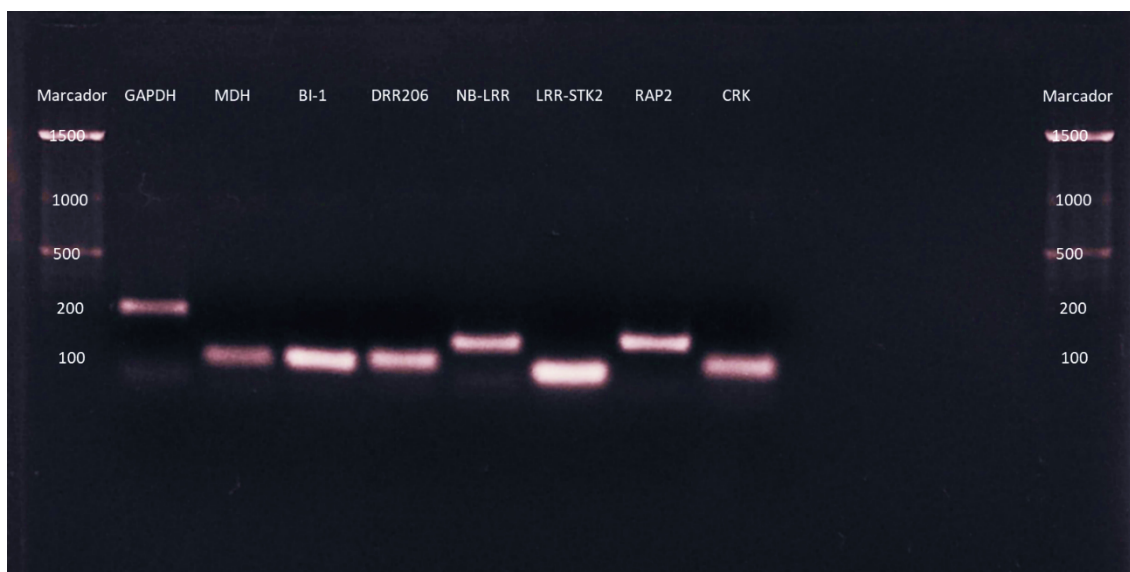


Figura 28. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos fragmentos amplificados pelos *primers* utilizados: GAPDH, MDH, BI-1, DRR206, NB-LRR, LRR-STK2, RAP2 e CRK.

Foi observada a formação de bandas bem definidas e sem ocorrência de amplificações inespecíficas para os oito *primers* utilizados, com os tamanhos dos *amplicons* gerados correspondendo aos preditos *in silico*, sendo: GAPDH = 222 pb, MDH = 102 pb, BI-1 = 107 pb, DRR206 = 94 pb, NB-LRR = 144 pb, LRR-STK2 = 87 pb, RAP2 = 176 pb e CRK = 80 pb. Ressaltando que foi possível também fazer a validação da pureza dos cDNAs sintetizados, pois como os *primers* endógenos foram desenhados em região de junção éxon-éxon caso ocorresse contaminação com DNA genômico esperava-se a formação de bandas inespecíficas com tamanhos de 385 pb para o GAPDH e 234 pb para o MDH, o que não ocorreu neste trabalho.

5.9. Eficiência dos *primers*

Para o cálculo de eficiência dos *primers* utilizou-se o *software* MINER 4.0, o qual é baseado no método descrito por Zhao; Fernald (2005), sendo por meio das análises das fluorescências provenientes, calculada a eficiência para todos os *primers* em

cada cDNA, incluindo os genótipos controle (não inoculado). Posteriormente, calculou-se a média para cada *primer*, observando-se uma eficiência variável entre 85 a 90% (Tabela 9).

Tabela 9. Eficiência dos *primers* GAPDH (normalizador), MDH (normalizador), BI-1, DDR206, NB-LRR, LRR-STK2, RAP2 e CRK.

<i>Primers</i>	GAPDH	MDH	BI-1	DDR206	NB-LRR	LRR-STK2	RAP2	CRK
Eficiência	0,85	0,85	0,85	0,88	0,90	0,86	0,85	0,89

Em seguida, esses dados de eficiência foram utilizados no *software* REST-2009 para efetuar os cálculos de expressão relativa de cada gene nos pontos previamente selecionados como base para o estudo. Esse método de análise de expressão leva em consideração a eficiência de cada *primer*, sendo recomendado quando os mesmos apresentam uma variação em torno de 5% em relação aos normalizadores. Sua escolha apresenta ainda como vantagem o fato de aumentar a reprodutibilidade do experimento, uma vez que o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVACK; SCHIMITTGEN, 2001) considera todos os *primers* com 100 % de eficiência.

5.10. Expressão relativa dos genes selecionados nos genótipos suscetível (CCN51) e resistente (TSH1188), analisando cada ponto de coleta separadamente e comparando cada genótipo ao seu respectivo controle.

As reações de RT-qPCR foram feitas e os resultados de expressão relativa, nos genótipos suscetível (CCN51) e resistente (TSH1188), foram calculados utilizando o *software* REST-2009. Para os cálculos, como genes de referência utilizou-se o GAPDH, e o MDH. Para os seis pontos em que foram realizadas as coletas observou-se os respectivos níveis de expressão relativa para os genes *BI-1*, *LRR-STK*, *RAP2*, *DDR206*, *NB-LRR* e *CRK*, ressaltando que, ao longo dos 40 ciclos da reação, em determinados tempos não houveram a formação de Ct para alguns dos genes em estudo.

No ponto de 4 hai (Figura 23) observou-se no genótipo resistente (TSH1188) inoculado que os genes *BI-1*, *LRR-STK* e *RAP2* apresentaram níveis de expressão, respectivamente, iguais a 2,40; 2,23 e 1,78 vezes acima dos apresentados no mesmo genótipo resistente não inoculado. Para o genótipo suscetível (CCN51) inoculado notou uma redução nos níveis de expressão dos genes *BI-1*, *LRR-STK*, *RAP2* e *DDR206*,

respectivamente, de 10,00; 16,67; 3,45 e 8,33 vezes menores que aos apresentados genótipo CCN51 não inoculado.

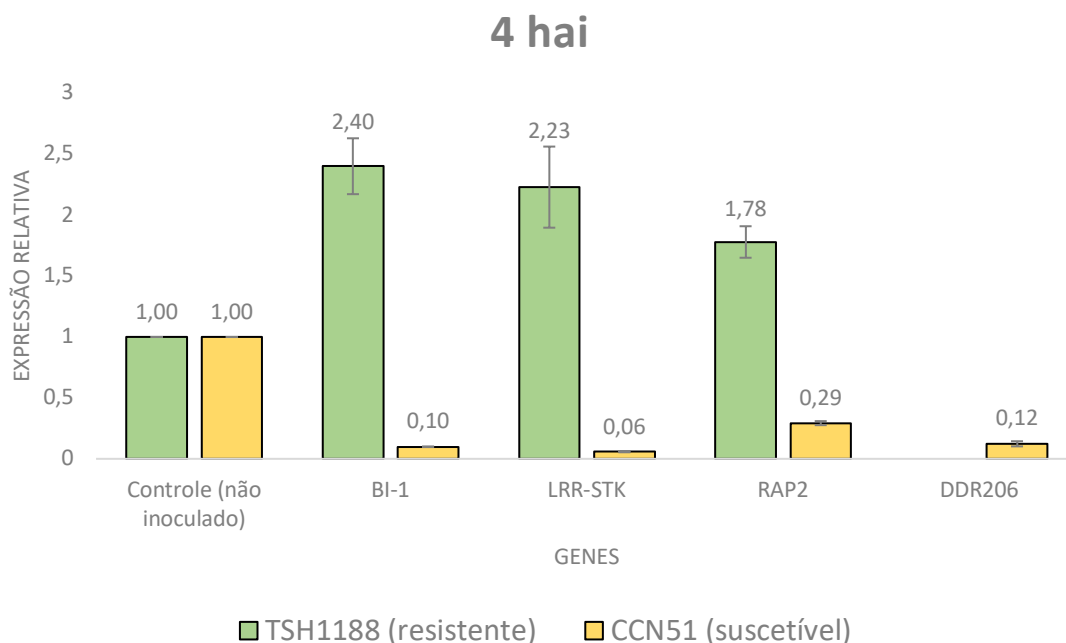


Figura 29. Dados de expressão relativa, calculados no *software* REST-2009, dos genes *BI-1*, *LRR-STK*, *RAP2* e *DDR206* para o ponto de 4 hai nos genótipos TSH1188 (resistente) e CCN51 (suscetível).

Nesse ponto inicial de 4 hai, em estudos cinéticos e histopatológicos, no genótipo resistente foi detectada uma rápida ativação do sistema defesa e consequentemente uma restrita colonização pelo fungo. Já no genótipo suscetível ao *C. cacaofunesta*, foi verificada a infecção vascular com uma lenta ativação, ou não ativação do sistema de defesa, sendo adicionalmente observadas a presença de toxinas do fungo em estudo (SANTOS et al., 2013a). Isso corrobora com níveis superiores de expressão no genótipo TSH1188 e com as reduções nos níveis de expressão no genótipo CCN51, para os genes estudados neste trabalho.

No ponto de 24 hai (Figura 24) notou-se que, no TSH 1188 inoculado, os genes *BI-1*, *LRR-STK* e *RAP2* apresentaram níveis de expressão, respectivamente, a igual a 1,61; 1,79 e 1,14 vez superior aos apresentados no mesmo genótipo não inoculado. Em relação ao CCN 51, notou-se que genes *BI-1*, *LRR-STK* e *RAP2* apresentaram, respectivamente, uma regulação de 1,51; 1,75 e 1,19 vez menor do que os apresentados no CCN51 não inoculado.

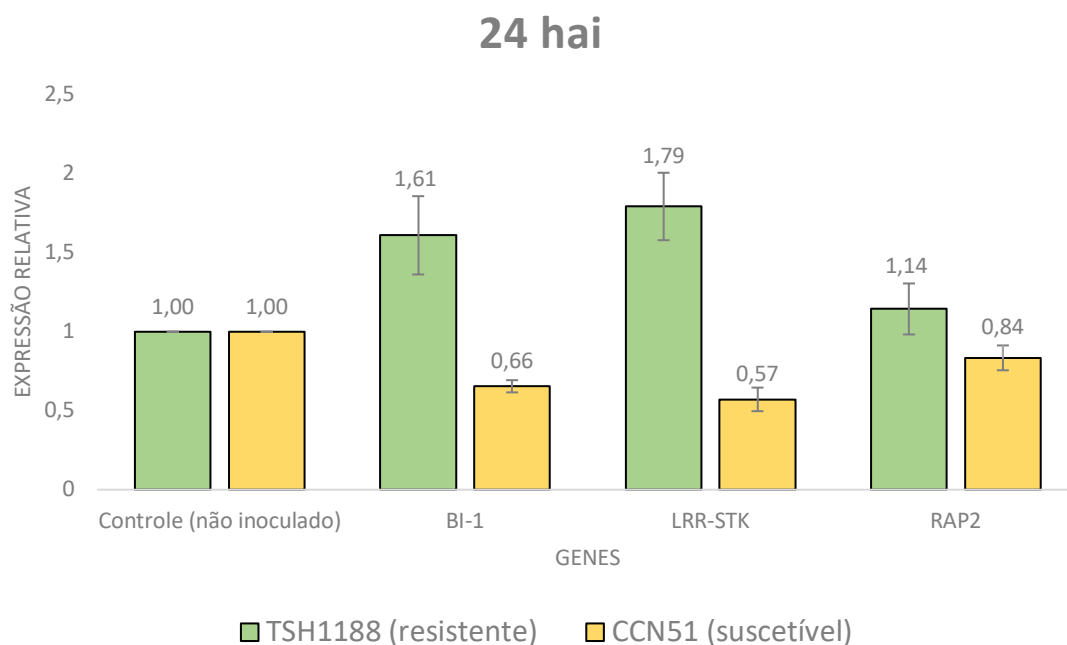


Figura 30. Dados de expressão relativa, calculados no *software* REST-2009, dos genes *BI-1*, *LRR-STK* e *RAP2* para o ponto de 24 hai nos genótipos TSH1188 (resistente) e CCN51 (suscetível).

Em genótipo suscetível inoculado com o fungo *C. cacaofunesta* foi demonstrado, a partir das 12 hai, o início do escurecimento das células parenquimáticas que circundavam os vasos xilemáticos (SANTOS, et al., 2013a). Neste trabalho até o ponto de 24 hai foi observado reduções nos níveis expressão dos genes *BI-1*, *LRR-STK* e *RAP2*, o que possivelmente pode estar contribuindo, direta ou indiretamente, com a manifestação dos sintomas supracitados.

No ponto de 48 hai (Figura 25), ao analisar-se o genótipo resistente inoculado notou-se picos de superexpressão para os genes *BI-1* e *LRR-STK*, sendo respectivamente, 17,81 e 32,67 vezes maiores do que o genótipo resistente não inoculado. Para o gene *RAP2*, nesse mesmo genótipo resistente inoculado, notou-se uma pequena redução de 1,49 vez em relação ao resistente não inoculado. Em relação ao genótipo suscetível inoculado, observou-se que os genes *BI-1* e *LRR-STK* apresentaram, respectivamente, uma regulação igual a 1,46; 1,74 vez acima dos apresentados no genótipo suscetível não inoculado.

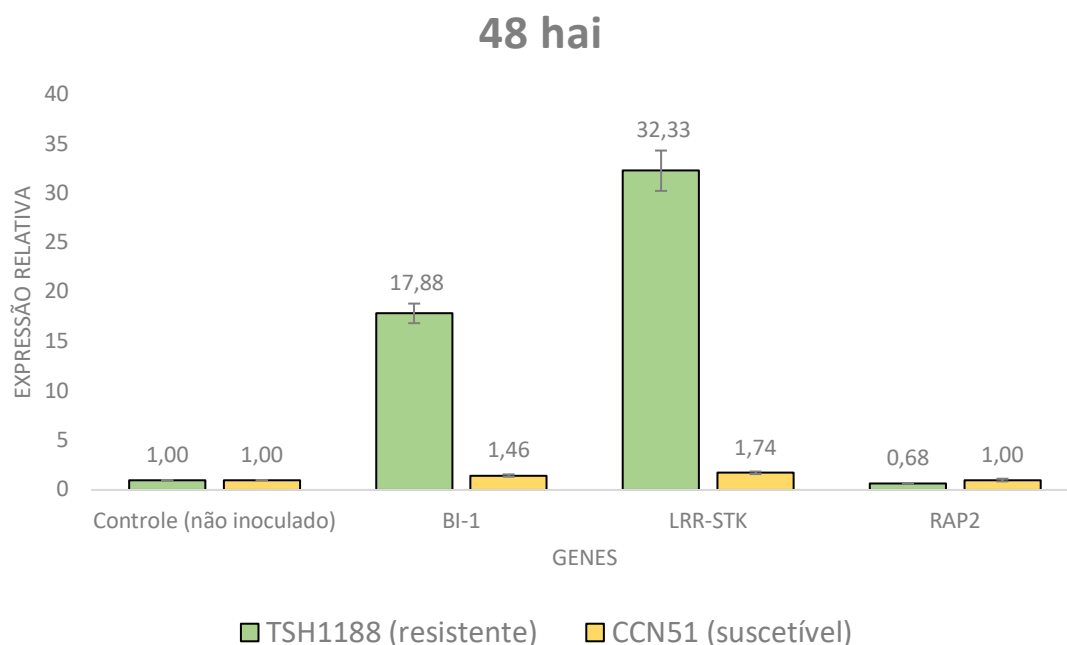


Figura 31. Dados de expressão relativa, calculados no *software* REST-2009, dos genes *BI-1*, *LRR-STK* e *RAP2* para o ponto de 48 hai nos genótipos TSH1188 (resistente) e CCN51 (suscetível).

Em genótipo resistente inoculado com *C. cacaofunesta* foi proposto um modelo que demonstra uma rápida ativação do sistema defesa, sendo embasado a partir da restrição da colonização dos vasos xilemáticos observados em análises histopatológicas (SANTOS et al., 2013a). Isso corrobora com os picos de expressão dos genes *BI-1* e *LRR-STK* encontrados às 48 hai para mesma interação estudada neste trabalho.

No ponto de 72 hai (Figura 26), analisando o genótipo TSH1188 inoculado, notou-se que os genes *BI-1*, *LRR-STK* e *RAP2* apresentaram, respectivamente, expressões de 1,59; 1,76 e 1,49 vez superior em relação ao seu controle não inoculado, enquanto que o gene *NB-LRR* apresentou uma expressão 1,41 inferior. No genótipo CCN51 inoculado observou-se regulações positivas para os genes *BI-1*, *LRR-STK* e *RAP2*, respectivamente, de 4,82; 3,20 e 3,89 vezes acima dos níveis apresentados no CCN51 não inoculado.

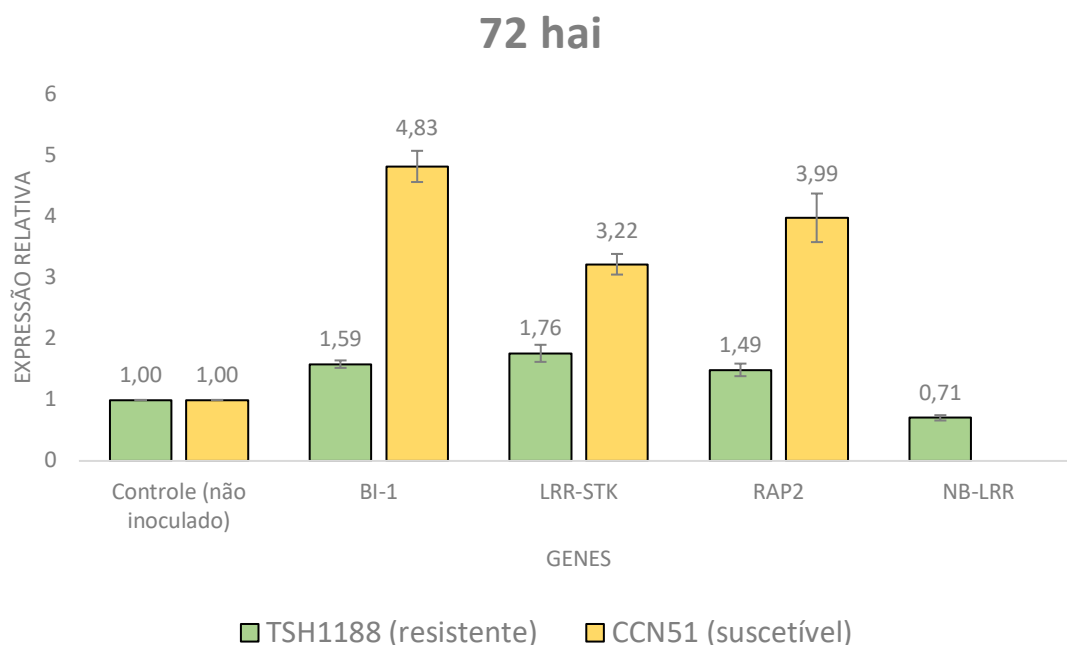


Figura 32. Dados de expressão relativa, calculados no *software* REST-2009, dos genes *BI-1*, *LRR-STK*, *RAP2* e NB-LRR para o ponto de 72 hai nos genótipos TSH1188 (resistente) e CCN51 (suscetível).

Nos estudos cinéticos e histopatológicos do genótipo suscetível inoculado com *C. cacaofunesta* foi detectado uma tentativa de resposta nesse genótipo as 72 hai, a qual manifesta-se na forma de acumulação de amido no xilema, podendo inclusive favorecer a obstrução dos vasos xilemáticos e reduzindo assim a translocação de água através desses (SANTOS et al., 2013a). Neste trabalho uma possível tentativa de resposta às 72 hai também foi observada, demonstrando-se através dos maiores níveis de expressão dos genes *BI-1*, *LRR-STK* e *RAP2*.

No ponto de 7 dai (Figura 27), para o genótipo TSH1188 inoculado, notou-se uma regulação nos genes *RAP2* e *CRK*, respectivamente, de 2,38 e 3,13 vezes abaixo dos níveis exibidos no TSH1188 não inoculado. Já os genes *BI-1* e *LRR-STK* apresentaram níveis de expressões semelhantes aos exibidos no controle. No genótipo CCN51 inoculado, os genes *BI-1*, *LRR-STK*, *RAP2* e *CRK* sofreram diminuições em seus níveis de expressão, respectivamente, de 1,20; 2,27, 1,45 e 9,09 vezes inferior aos níveis apresentados no CCN51 não inoculado.

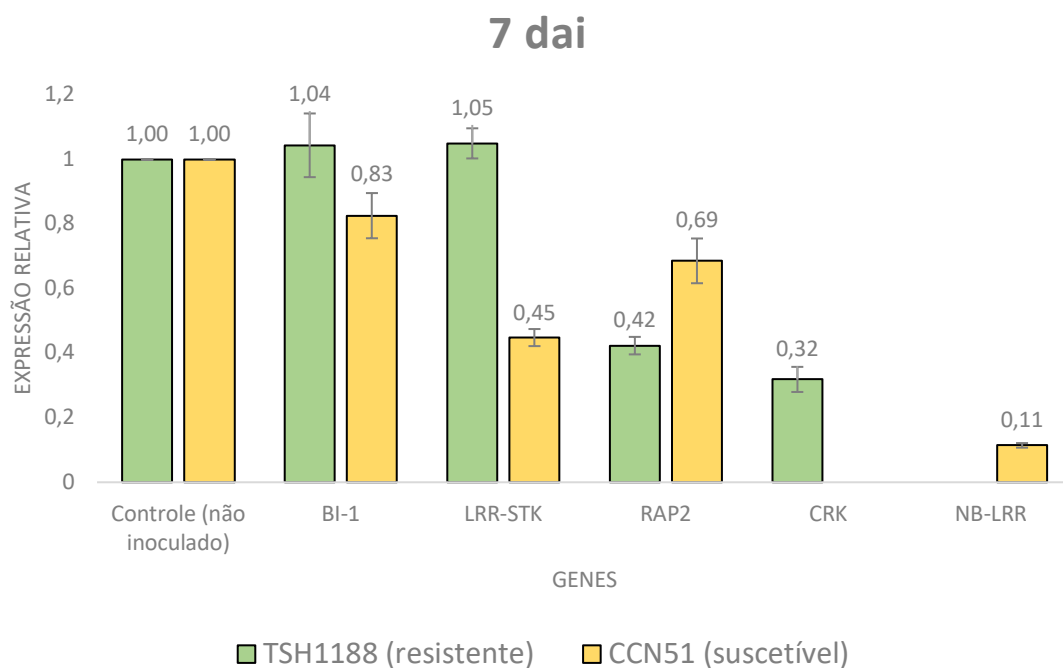


Figura 33. Dados de expressão relativa, calculados no *software* REST-2009, dos genes *BI-1*, *LRR-STK*, *RAP2* e *NB-LRR* para o ponto de 7 dai nos genótipos TSH1188 (resistente) e CCN51 (suscetível).

A partir do ponto de 7 dai, em estudos histopatológicos, observou-se no genótipo suscetível inoculados uma colonização progressiva com uma lenta eliminação ou não eliminação do fungo, enquanto que no genótipo resistente uma zona de reação com limitada colonização (SANTOS et al., 2013a). Neste trabalho, para o mesmo ponto, foi observado que os genes *BI-1*, *LRR-STK*, *RAP2* e *NB-LRR* foram *down* regulados, já no genótipo resistente detectou-se uma redução na expressão do fator de transcrição *RAP2* e no receptor *CRK*.

No ponto de 15 hai (Figura 28), ao analisar o genótipo resistente inoculado observou-se uma redução no nível de expressão do gene *RAP2* de 3,85 vezes abaixo do nível apresentado no mesmo genótipo não inoculado. Para os genes *BI-1* e *LRR-STK* foram detectados níveis de expressão, respectivamente, iguais a 1,90 e 3,56 vezes acima dos apresentados no controle. No genótipo suscetível inoculado observou-se uma redução nos níveis de expressão dos genes *BI-1* e *RAP2*, respectivamente, de 3,85 e 2,50 vezes abaixo dos níveis apresentados no genótipo suscetível não inoculado.

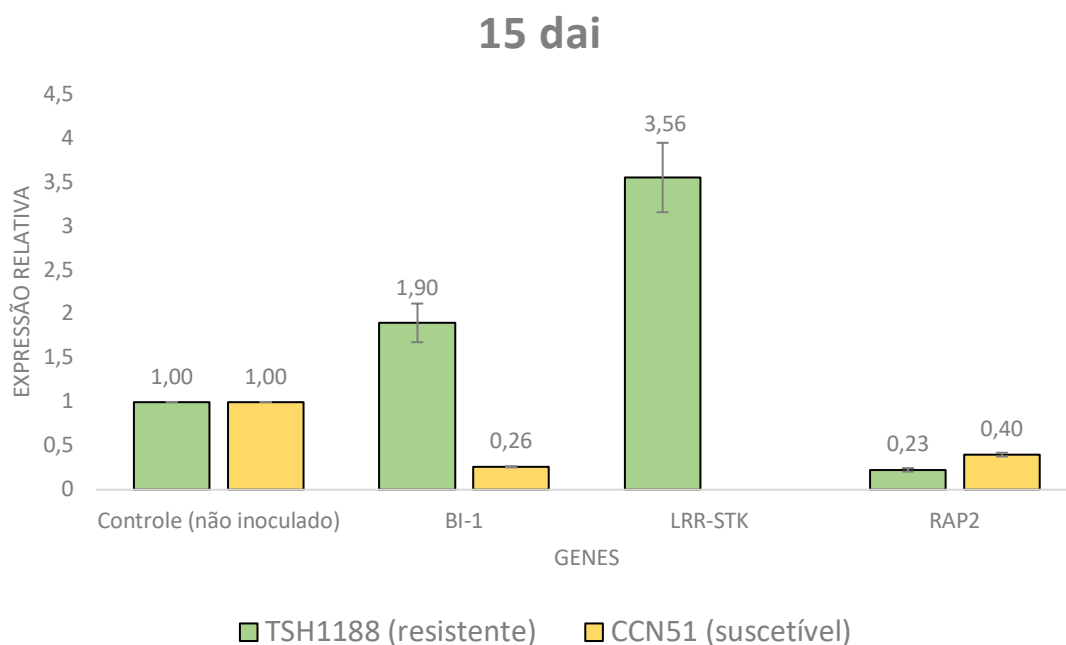


Figura 34. Dados de expressão relativa, calculados no *software* REST-2009, dos genes *BI-1*, *LRR-STK*, *RAP2* para o ponto de 15 dai nos genótipos TSH1188 (resistente) e CCN51 (suscetível).

Aos 15 dai, mediante estudos histopatológicos, constatou-se no genótipo suscetível inoculado com o *C. cacaofunesta* uma extensiva oclusão dos vasos xilemáticos exteriorizando-se fenotipicamente em forma de murcha, já para o genótipo resistente não houve a detecção de sintomas externos (SANTOS et al., 2013a). Neste trabalho, nesse mesmo ponto no genótipo, ocorreu uma redução nos níveis de expressão *BI-1* e *RAP2*, e para o *LRR-STK* não houve nem a detecção de Ct.

5.11. Expressão relativa dos genes *BI-1*, *LRR-STK* e *RAP2*, comparando seu comportamento entre os genótipos suscetível (CCN51) e resistente (TSH1188) ao longo de todos os seis pontos de coleta.

A partir das análises feitas anteriormente observou-se que os genes *BI-1*, *LRR-STK* e *RAP2* se expressaram em todos os pontos de coleta em estudo, sendo assim selecionados fazer comparações estatísticas dos seus respectivos níveis de expressão, nos genótipos CCN51 e TSH1188, ambos inoculados, ao longo dos seis pontos de coleta (para cada genótipo separadamente), onde primeiramente utilizou-se análise de variância (ANOVA) para verificar a existência de diferença significativa entre os pontos; utilizando-se ainda, para efetuar a comparação entre os pontos, o teste de Scott-knott (JELIHOVSCHI; FARIA; ALLAMAN, 2014) a 5% de significância. Foi avaliado também se houve ou não a existência de diferença significativa nos níveis de expressão

desses genes, entre os genótipos suscetível e resistente, em cada ponto de coleta específico, usando-se a ANOVA e considerando-se o nível de 5% de significância.

Ao analisar o gene *BI-1* (Figura 29), no genótipo TSH1188, observou-se um maior nível de expressão no ponto de 48 hai, sendo que nos demais pontos os níveis de expressão não se diferenciaram estatisticamente entre si. No genótipo CCN51 o nível de expressão mais elevado foi detectado no ponto de 72 hai, enquanto o menor foi nos pontos de 4 hai e 15 dai. Ao comparar os genótipos resistente e suscetível entre si, notou-se que nos pontos de coleta as 4 hai, 24 hai, 48 hai e 15 dai o gene *BI-1* apresenta um maior nível de expressão relativa no genótipo resistente, destacando-se nos pontos de 4 hai e 48 hai, onde alcança um nível de expressão, respectivamente, de 24,30 e 12,11 vezes maior em relação ao genótipo suscetível. O genótipo suscetível apresentou um maior nível de expressão ao resistente apenas no ponto de 72 hai, apresentando uma diferença de 3,03 vezes superior. No ponto de 7 dai não houve diferença significativa entre os dois genótipos estudados.

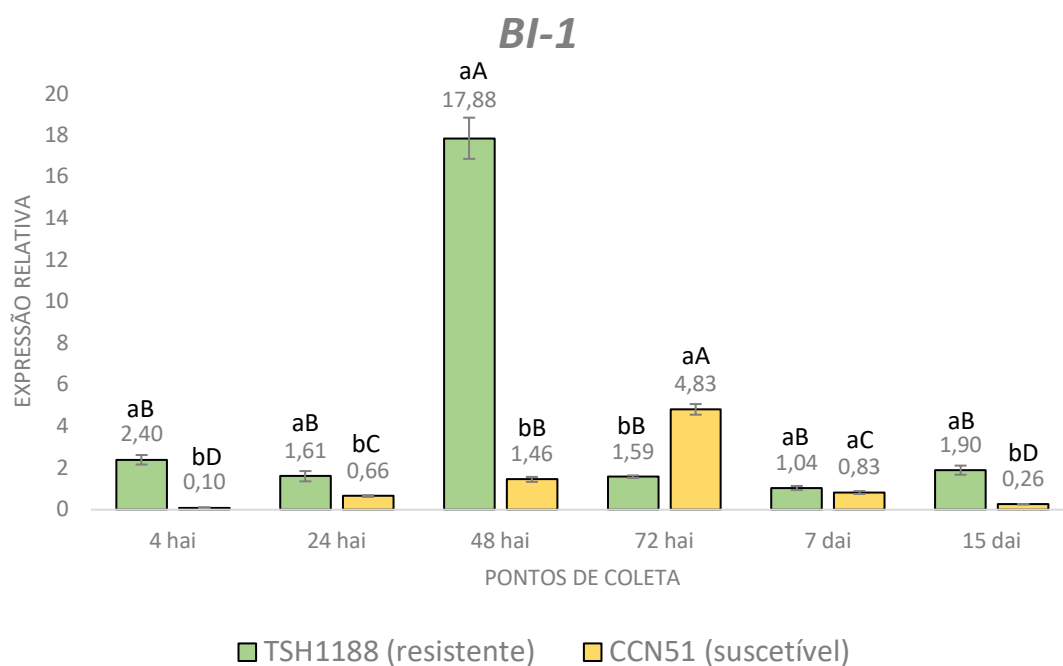


Figura 35. Dados de expressão relativa, calculados no *software* REST-2009, do gene *BI-1* ao longo dos seis pontos de coleta nos genótipos TSH1188 (resistente) e CCN51 (suscetível), sendo feita a comparação dos níveis de expressão do *BI-1*, em cada genótipo separadamente, ao longo dos pontos de coleta; e comparando a expressão do *BI-1* entre o genótipo TSH1188 e CCN51 em cada ponto de coleta específico. As letras maiúsculas foram utilizadas para comparar a expressão do *BI-1* EM CADA GENÓTIPO, separadamente, AO LONGO DOS PONTOS DE COLETA. As letras minúsculas foram utilizadas para

realizar a comparação ENTRE OS GENÓTIPOS, TSH1188 e CCN51, EM CADA PONTO DE COLETA ESPECÍFICO.

Os resultados de maiores níveis de expressão relativas apresentados no genótipo resistente em relação ao suscetível são esperados. Em trabalhos prévios, a superexpressão do *BAX-inhibitor* já havia se mostrado eficiente na supressão do *BAX*, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e morte celular induzida por ácido salicílico (KAWAI-YAMADA et al., 2004; ISHIKAWA et al., 2013), podendo limitar a colonização por patógenos necrotróficos e hemibiotróficos, como *Magnaporthe grisea* (MATSUMURA et al., 2003), *Fusarium graminearum* (BABAEIZAD et al., 2009), *S. sclerotium*, *Sclerotium rolfii*, *Botrytis cinerea* e *Moniliophthora perniciosa* (SCOTTON et al., 2017). Além disso, as análises *in silico* realizadas neste trabalho propõem possíveis genes que poderão possivelmente ser ativados de forma *downstream* após o pico de expressão de *BI-1* que acontece no genótipo resistente às 48 hai. Viu-se que nessa cascata estão genes envolvidos com respostas a ataques de patógenos, estresses ambientais, estresses oxidativos e desenvolvimento de plantas (GAGUANCELA et al., 2016; KANG et al., 2006; NAGANO et al., 2012); outros membros da família *Bax-Inhibitor 1* que atuam como inibidores de apoptose (KAWAI-YAMADA et al., 2001); mediadores no controle de várias enzimas, canais iônicos e outras proteínas por Ca^{2+} (TAKAHASHI et al., 2011); reforçando assim a hipótese do envolvimento do *BI-1* no desencadeamento, direta e/ou indiretamente, de respostas de defesa contra o fungo *C. cacaofunesta*.

Ao analisar o gene *LRR-STK* (Figura 30), novamente notou-se, que para o genótipo TSH1188 o maior nível de expressão aconteceu às 48 hai. Para os demais pontos estudados não houve diferenças significativas entre si. Em relação ao genótipo CCN51, o ponto em que se observou uma maior expressão de *LRR-STK* foi as 72 hai, enquanto o menor ocorreu às 4 hai, ressaltando que no ponto de 15 hai não houve a detecção de Ct para o gene em estudo. Ao observar cada ponto específico, comparando o TSH1188 com o CCN51, notou-se que no genótipo TSH1188 o gene *LRR-STK* apresentou um maior nível de expressão em relação ao genótipo CCN51 para todos os pontos em estudo, exceto as 72 hai, destacando-se os pontos de 4 hai e 48 hai, onde apresentou níveis de expressão relativa, respectivamente, 37,67 e 18,88 vezes superior em comparação com as apresentadas no genótipo suscetível. O ponto em que a expressão de *LRR-STK* foi maior no genótipo CCN51 ocorreu apenas as 72 hai, sendo 1,84 vez superior quando comparada com a apresentada no TSH1188.

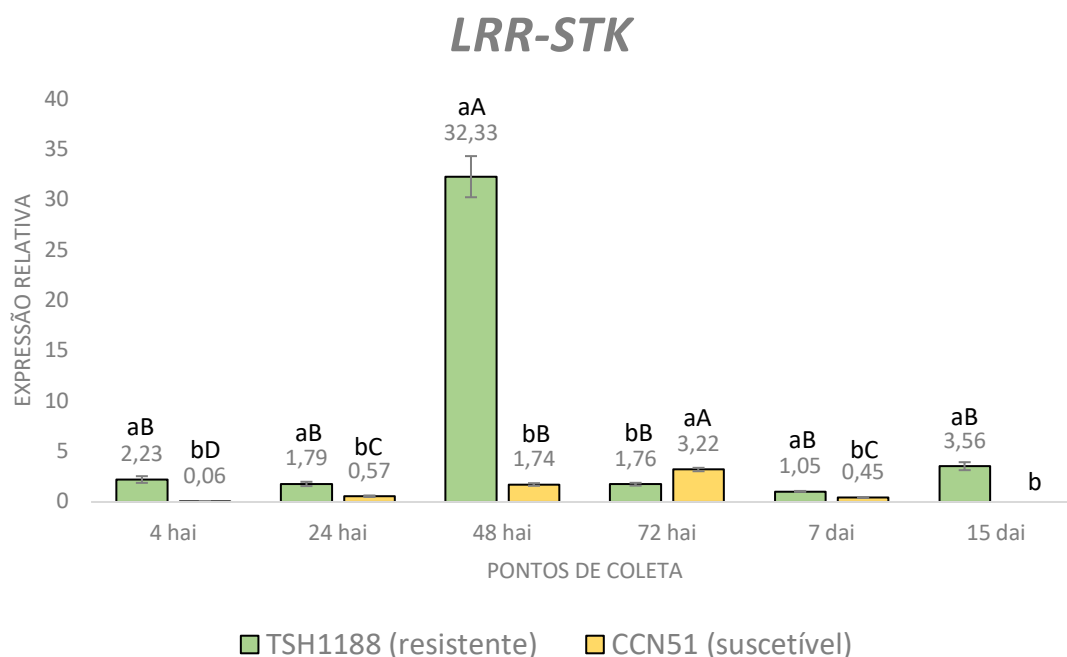


Figura 36. Dados de expressão relativa, calculados no *software* REST-2009, do gene *LRR-STK* ao longo dos seis pontos de coleta nos genótipos TSH1188 (resistente) e CCN51 (suscetível), sendo feita a comparação dos níveis de expressão do *LRR-STK*, em cada genótipo separadamente, ao longo dos pontos de coleta; e comparando a expressão do *LRR-STK* entre o genótipo TSH1188 e CCN51 em cada ponto de coleta específico. As letras maiúsculas foram utilizadas para comparar a expressão do *LRR-STK* EM CADA GENÓTIPO, separadamente, AO LONGO DOS PONTOS DE COLETA. As letras minúsculas foram utilizadas para realizar a comparação ENTRE OS GENÓTIPOS, TSH1188 e CCN51, EM CADA PONTO DE COLETA ESPECÍFICO.

Os resultados de superexpressão, principalmente as 48 hai, do gene *LRR-STK* no genótipo resistente em relação ao suscetível são esperados. Genes pertencentes a esse grupo são considerados como receptores e desempenham papel central no reconhecimento de fitopatógenos e posterior desencadeamento da ativação dos mecanismos de defesa da planta (AFZAL; WOOD; LIGHTFOOT, 2008). Em trabalhos prévios a superexpressão de genes receptores mostrou-se responsáveis por respostas de defesa vegetal contra vários patógenos necrotróficos e/ou hemibiotróficos, destacando-se em *arabidopsis-Botrytis cinerea* (HUANG et al., 2013), tabaco-*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (GAO et al., 2015), algodão-*Verticillium dahliae* (JUN et al., 2015), arroz-*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e *Magnaporthe oryzae* (HARKENRIDER et al., 2016) e citros-*Xanthomonas citri* subsp. *citri* (LI et al., 2020). Os resultados de repressão no genótipo suscetível também estão de acordo, pois o *C. cacaofunesta* tem a capacidade de secretar um arsenal de efetores e proteases que podem

suprimir a defesa a defesa da planta e a modular fisiologicamente para benefício do fungo (MOLANO et al., 2018). Os resultados encontrados nas interações *in silico* também reforçam o papel do *LRR-STK* no desencadeamento de respostas de resistência, visto que ele possivelmente interage com outros que estão envolvidas na organização e/ou modificação de paredes celulares (UNO et al., 2017; REEM et al., 2018) e responsáveis pela biossíntese e degradação de lignina, suberização e respostas a estresses ambientais, como ferimentos, ataque de patógenos e estresse oxidativo (TOGNOLLI et al., 2002), isso pode ser indício que o *LRR-STK* pode estar direta ou indiretamente envolvido em uma via de sinalização que inicia-se com o reconhecimento do patógeno, prosseguindo-se com a síntese dos mecanismos pós-formados supracitados.

Analisando-se o gene *RAP2* (Figura 31), verificou que no TSH1188 o maior nível de expressão desse gene deu-se às 4 hai, enquanto as menores expressões relativas foram detectadas nos pontos de 7 dai e 15 dai. Já no CCN51 os maiores níveis de expressão relativa de *RAP2* aconteceu às 72 hai, e os menores níveis nos pontos de 4 hai e 15 dai. Quando se compara os genótipos TSH1188 e CCN51 em cada ponto específico, notou-se uma maior expressão de *RAP2* no genótipo resistente em relação ao suscetível apenas as 4 hai, sendo essa diferença equivalente a 6,10 vezes. Nos pontos de 24 hai e 15 dai os níveis de expressão do gene em estudo ocorreu de forma semelhante entre os dois genótipos. Nos pontos de 48 hai, 72 hai e 7 dai o nível de expressão relativa de *RAP2* foram maiores no genótipo suscetível, destacando-se o ponto de 72 hai, onde houve uma diferença de 2,61 vezes entre os dois genótipos.

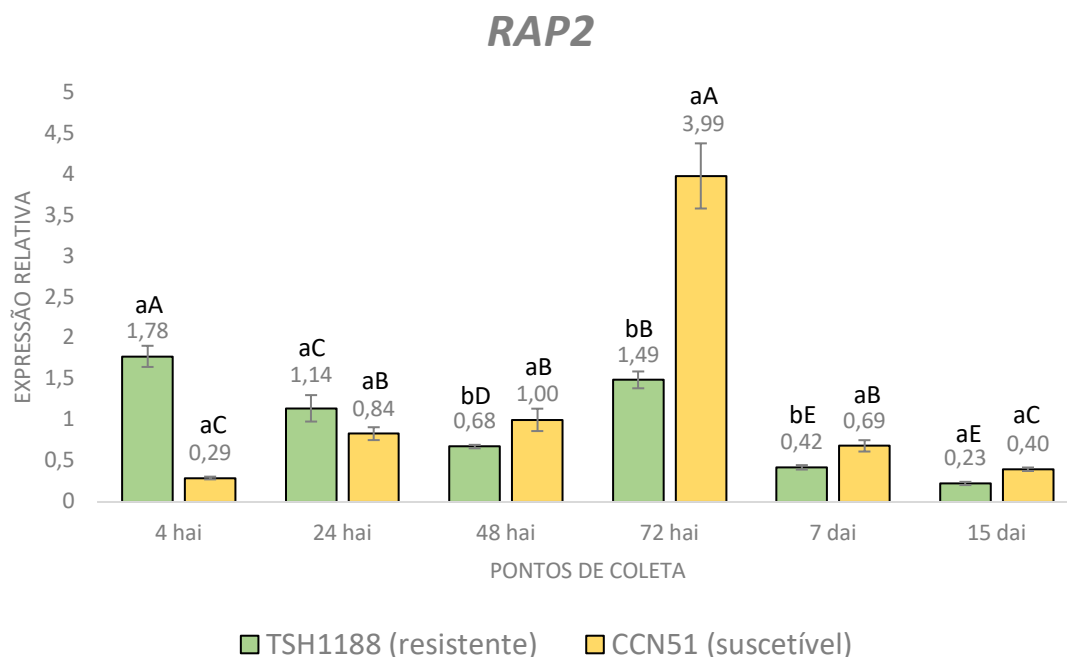


Figura 37. Dados de expressão relativa, calculados no *software* REST-2009, do gene *RAP2* ao longo dos seis pontos de coleta nos genótipos TSH1188 (resistente) e CCN51 (suscetível), sendo feita a comparação dos níveis de expressão do *RAP2*, em cada genótipo separadamente, ao longo dos pontos de coleta; e comparando a expressão do *RAP2* entre o genótipo TSH1188 e CCN51 em cada ponto de coleta específico. As letras maiúsculas foram utilizadas para comparar a expressão do *RAP2* EM CADA GENÓTIPO, separadamente, AO LONGO DOS PONTOS DE COLETA. As letras minúsculas foram utilizadas para realizar a comparação ENTRE OS GENÓTIPOS, TSH1188 e CCN51, EM CADA PONTO DE COLETA ESPECÍFICO.

Apesar de já ser bem caracterizado como responsivo a possíveis em outros patossistemas envolvendo patógenos hemibiotróficos e/ou necrotróficos (PEREIRA et al., 2020; ZHAO et al., 2012), o fator de *RAP2* ainda não havia sido estudado na interação cacau-*C. cacaofunesta*. O *RAP2* está envolvido com respostas envolvendo síntese de etileno, o que pode implicar em importantes papéis nas vias de sinalização de defesa vegetal (ZHAO et al., 2012). Essa redução inicial do *RAP2* no genótipo suscetível, o que não acontece no genótipo resistente, pode estar implicando na não ativação precoce de cascatas de sinalização dependentes da participação desse fator de transcrição. As análises *in silico* realizadas reforçam esta hipótese, visto que o *RAP2* pode estar interagindo diretamente e/ou indiretamente com genes que mediam a ubiquitinação e subsequente degradação de proteínas alvos (QI et al., 2017) e que desempenham papel na regulação da duração e amplitude de respostas de defesa, regulando também a biossíntese de metabólitos envolvidos no sistema de defesa (DE

MARCHI et al., 2016). Em contrapartida, o maior nível de expressão de *RAP2* no genótipo suscetível em relação ao resistente ocorre as 72 hai, podendo demonstrar uma tentativa de resposta tardia e mal sucedida, visto que o patógeno já tem seu processo de colonização iniciado (SANTOS et al., 2013a). Inclusive, por ser um patógeno que atua principalmente necrosando as células colonizadas com consequente obstrução dos vasos xilemáticos (SANTOS et al., 2013a), a estimulação de síntese de etileno pode contribuir com seu processo de patogenicidade e exteriorização dos sintomas de murcha, já que esse fitohormônio, em trabalhos envolvendo a interação entre o fungo hemibiotrófico *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* e o tomateiro, demonstrou-se importante no desenvolvimento de sintomas de murcha vascular após a infecção se tornar sistêmica na planta (LUND; STALL; KLEE, 1998). Em mamona, o tratamento com etileno em plantas intactas com folhas excisadas ocasionou na formação de gel e posterior oclusão xilemática da planta (VANDERMOLEN et al., 1983). Uma constatação semelhante a essa foi feita ao se analisar histologicamente partes do caule do genótipo suscetível de *T. cacao* 72 horas após a inoculação com o fungo *C. cacaofunesta* (SANTOS et al., 2013a).

6. CONCLUSÕES

As proteínas *CRK10*, *LRR-STK*, *BI-1*, *DRR206*, *NB-LRR*, *PR5* e *RAP2* podem ser consideradas como *hubs*, sendo identificadas complexas redes de interações relacionadas com possíveis respostas de resistência.

Existem diferenças nos perfis de expressão dos genes *LRR-STK*, *BI-1* e *RAP2* entre os genótipos TSH1188 e CCN51 e entre os tempos estudados.

O genótipo TSH1188 apresenta picos de superexpressão dos genes *LRR-STK* e *BI-1* 48 horas após a inoculação com o fungo *C. cacaofunesta*.

No genótipo CCN51 ocorre reduções nos níveis de expressão dos genes *LRR-STK*, *BI-1*, *RAP2* e *DRR206* quatro horas após a inoculação com o fungo *C. cacaofunesta*.

Às 72 horas após a inoculação com o fungo *C. cacaofunesta*, ocorre uma possível tentativa de resposta de resistência no genótipo suscetível, porém menos intensa e mais tardia quando comparada ao genótipo resistente.

A partir do sétimo dia após a inoculação, inicia-se a externalização dos sintomas de murcha no genótipo CCN51 inoculado com o fungo *C. cacaofunesta*, ocorrendo concomitantemente redução nos níveis de expressão dos genes *BI-1*, *LRR-STK* e *RAP2*.

7. REFERÊNCIAS

- ABAD, L. R. et al. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. **Plant Science**, v. 118, n. 1, p. 11–23, 1996.
- ACHARYA, B. R. et al. Overexpression of CRK13, an Arabidopsis cysteine-rich receptor-like kinase, results in enhanced resistance to *Pseudomonas syringae*. **Plant Journal**, v. 50, n. 3, p. 488–499, 2007.
- ÁDÁM, A. L. et al. Signals of systemic immunity in plants: Progress and open questions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1–21, 2018.
- AFZAL, A. J.; WOOD, A. J.; LIGHTFOOT, D. A. Plant receptor-like serine threonine kinases: Roles in signaling and plant defense. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 5, p. 507–517, 2008.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5 ed. San Diego: Academic Press, 2004. 922 p.
- AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, K. I.; HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 824–827, 2005.
- ALARCON, C. R. M. **Determinacion de Resistencia de 250 Clones de Cacao de Origen Nacional al Ataque de Mal-de-Machete (*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted)**. (Tesis de Grado). Universidad Agrária del Ecuador. Guayaquil, Ecuador, 1994.
- ALI, M. A. et al. Overexpression of the transcription factor RAP2.6 leads to enhanced callose deposition in syncytia and enhanced resistance against the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* in Arabidopsis roots. **BMC Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.
- ALI, S. S. et al. *Phytophthora megakarya* and *P. palmivora*, causal agents of black pod rot, induce similar plant defense responses late during infection of susceptible cacao pods. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. February, p. 1–18, 2017.
- ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. et al. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 33, n. 21, p. 3387–3395, 2017.
- ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420–423, 2019.
- ALMEIDA L.C.C; COSTA, A. Z. M.; BEZERRA, J. L. Distribuição geográfica da murcha-de-Ceratocystis do cacaueiro na Bahia, Brasil. **Agrotrópica**, v. 17, p. 83-86, 2005.
- AMBROSIO, A. B. et al. Global analyses of *Ceratocystis cacaofunesta* mitochondria: From genome to proteome. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, 2013.
- ANDERSON, R. G. et al. Recent Progress in RXLR Effector Research. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 10, p. 1063–1072, 2015.

- APOGA, D. et al. Quantification of substratum contact required for initiation of *Colletotrichum graminicola* appressoria. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 1, p. 1–12, 2004.
- ARGOUT, X. et al. Towards the understanding of the cocoa transcriptome: Production and analysis of an exhaustive dataset of ESTs of *Theobroma cacao* L. generated from various tissues and under various conditions. **BMC Genomics**, v. 9, p. 1–19, 2008.
- ARGOUT, X. et al. The genome of *Theobroma cacao*. **Nature Genetics**, v. 43, n. 2, p. 101–108, 2011.
- BABAEIZAD, V. et al. Over-expression of the cell death regulator BAX inhibitor-1 in barley confers reduced or enhanced susceptibility to distinct fungal pathogens. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, n. 3, p. 455–463, 2009.
- BACKHOUSE, D.; WILLETTS, H. J. Development and structure of infection cushions of *Botrytis cinerea*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 89, n. 1, p. 89–95, 2009.
- BAKER, C. J. et al. Genetic Variability and Host Specialization in the Latin American Clade of *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**, v. 93, n. 10, p. 1274–1284, 2003.
- BAKER, C.J.; HARRINGTON, T.C. *Ceratocystis fimbriata*. In: BAKER, C.J.; HARRINGTON, T.C. **Crop Protection Compendium**. Kew: CABI Publishing, 2004. 14p.
- BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. na região Amazônica brasileira. **Acta Amazônica**, v. 8, n. 4, p. 543-544, 1978.
- BAYER, C.; KUBITZKI, K. Malvaceae. In: KUBITZKI, K. **The families and genera of vascular plants**. New York: Springer-verlag Berlin Heidelberg, 2003. p. 225-311.
- BBC. 5 razões que explicam por que o chocolate está ameaçado em todo o mundo, 2018. Disponível em: <<https://www.bbc.com/>>. Acesso em: 06. out. 2019.
- BECHINGER, C. et al. Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. **Science**, v. 285, n. 5435, p. 1896–1899, 1999.
- BECRAFT, P. W. Receptor Kinase Signaling in Plant Development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 18, n. 1, p. 163–192, 2002.
- BELKHADIR, Y.; SUBRAMANIAM, R.; DANGL, J. L. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 4, p. 391–399, 2004.
- BENDAHMANE, A. et al. The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of Rx1-mediated virus resistance in potato. **The Plant Journal**, v. 8, n. 6, p. 933-941, 1985.
- BENT, A. F.; MACKEY, D. Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 45, n. 1, p. 399–436, 2007.

- BENT, A. F. et al. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: A Leucine-Rich Repeat Class of Plant Disease Resistance Genes. **Science**, v. 265, p. 1856–1860, 1994.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed., São Paulo: Ceres, 1995. v.1, 907p.
- BEZERRA, J. L. *Ceratocystis fimbriata* causing death of budded cocoa seedlings in Bahia, Brazil. **Incoped Newsletter**, v. 1, p. 6, 1997.
- BEZERRA, J.L.; ALMEIDA O.C. de; LUZ E.D.M.N.; SILVA S.D.V.M. Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* em clones de cacau no Estado da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 228, 1998.
- BHATTACHARJEE, R.; AKORODA, M. Taxonomy and classification of cacao. **Burleigh Dodds Science Publishing**, p. 1–16, 2018.
- BLOM, N.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Sequence and Structure-based Prediction of Eukaryotic Protein Phosphorylation Sites. 1999.
- BONARDI, V.; DANGL, J. L. How complex are intracellular immune receptor signaling complexes? **Frontiers in Plant Science**, v. 3, p. 1–10, 2012.
- BUSHNELL, W. R. Physiology of fungal haustorial. **Annual Review of Phytopathology**, v. 10, n. 1, p. 151–176, 1972.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169–193, 2000.
- CABRERA, O. G. *Ceratocystis* Wilt Pathogens: History and Biology—Highlighting *C. cacaofunesta*, the Causal Agent of Wilt Disease of Cacao. In: BAYLEY, B. A.; MEINHARDT, L.W. **Cacao diseases**. Springer, 2016. p. 383–428.
- CAMPBELL, P.; BRAAM, J. In vitro activities of four xyloglucan endotransglycosylases from *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 18, n. 4, p. 371–382, 1999.
- CAPLAN, J.; PADMANABHAN, M.; DINESH-KUMAR, S. P. Plant NB-LRR Immune Receptors: From Recognition to Transcriptional Reprogramming. **Cell Host and Microbe**, v. 3, n. 3, p. 126–135, 2008.
- CHAKY, J. et al. Surface hydrophobicity and surface rigidity induce spore germination in *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 91, n. 6, p. 558–564, 2001.
- CHEN, F. et al. The WRKY Transcription Factor Family in Model Plants and Crops. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 36, n. 5–6, p. 311–335, 2017.
- CHEN, K. et al. Activation of hypersensitive cell death by pathogen-induced receptor-like protein kinases from *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, v. 56, n. 2, p. 271–283, 2004.
- CHEN, Z. A superfamily of proteins with novel cysteine-rich repeats. **Plant Physiology**, v. 126, n. 2, p. 473–476, 2001.

- CHOI, J. J.; KLOSTERMAN, S. J.; HADWIGER, L. A. A promoter from pea gene DRR206 is suitable to regulate an elicitor-coding gene and develop disease resistance. **Phytopathology**, v. 94, n. 6, p. 651–660, 2004.
- CHOREV, M.; CARMEL, L. The function of introns. **Frontiers in Genetics**, v. 3, n. APR, p. 1–15, 2012.
- COLL, N. S.; EPPLE, P.; DANGL, J. L. Programmed cell death in the plant immune system. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, n. 8, p. 1247–1256, 2011.
- CRAGG, S. M. et al. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 29, p. 108–119, 2015.
- CHISHOLM, S. T. et al. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 803–814, 2006.
- CHENG, S. H. et al. Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. **Plant Physiology**, v. 129, n. 2, p. 469–485, 2002.
- CUI, Y. et al. Plant extracellular vesicles. **Protoplasma**, v. 257, n. 1, p. 3–12, 2020.
- CULLEY, D. E.; HOROVITZ, D.; HADWIGER, L. A. Molecular characterization of disease-resistance response gene DRR206-d from *Pisum sativum* (L.). **Plant physiology**, v. 107, n. 1, p. 301–302, 1995.
- CZERNIC, P. et al. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* receptor-like protein kinase gene activated by oxidative stress and pathogen attack. **Plant Journal**, v. 18, n. 3, p. 321–327, 1999.
- DA HORA JUNIOR, B. T. et al. Transcriptomics and systems biology analysis in identification of specific pathways involved in cacao resistance and susceptibility to witches' broom disease. **Molecular BioSystems**, v. 8, n. 5, p. 1507–1519, 2012.
- DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell Death: Critical Control Points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205–219, 2004.
- DAND, R. **The international cocoa trade**. 3 ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2011 647 p.
- DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, n. June, p. 827–833, 2001.
- DANGL, J. L.; HORVATH, D. M.; STASKAWICZ, B. J. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. **Science**, v. 341, n. 6147, p. 746–751, 2013.
- DATTA, K. et al. Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmental friendly resistance to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 6–7, p. 1138–1145, 1999.

- DE LEÓN, I. P. et al. Involvement of the Arabidopsis α -DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. **Plant Journal**, v. 29, n. 1, p. 61–72, 2002.
- DE MARCHI, R. et al. The N-end rule pathway regulates pathogen responses in plants. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 1–15, 2016.
- DELGADO, R.; SUÁREZ, C. Diferencias en agresividad entre aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* de Ecuador y Brasil en cacao. **XII Seminario Nacional de Sanidad Vegetal**, Ecuador, p. 19-21, 2003.
- DESLANDES, L. et al. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 13, p. 8024–8029, 2003.
- DESROSIERS, R. Developments in the control of witches' broom, monilia pod rot and ceratostomella diseases of cacao. **Vlth Conf. Interamericana de Cacau Salvador, Bahia**, p. 73–78, 1956.
- DIETRICH, R. A. et al. A Novel Zinc Finger Protein Is Encoded by the Arabidopsis. **Cell**, v. 88, p. 685–694, 1997.
- DOMINGUEZ R., P. F.; VELASQUEZ, F. Seleccin de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) por resistencia al hongo *Ceratocystis fimbriata*. **Rev. Fac. Agron.**, v. 6, p. 57-73, 1972.
- DUFFAUD, G. D. et al. **Structure and Function of the Signal Peptide**. v. 24, 1985.
- DWIGHT, Z.; PALAIS, R.; WITTEWER, C. T. uMELT: Prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application. **Bioinformatics**, v. 27, n. 7, p. 1019–1020, 2011.
- EDERLI, L. et al. The *Arabidopsis thaliana* cysteine-rich receptor-like kinase CRK20 modulates host responses to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 infection. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 15, p. 1784–1794, 2011.
- ENGELBRECHT, C. J. B.; HARRINGTON, T. C. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. **Mycologia**, v. 97, n. 1, p. 57–69, 2005.
- EPSTEIN, L. et al. Extracellular Proteins Associated with Induction of Differentiation in Bean Rust Uredospore Germlings. **Physiology and Biochemistry**, v. 75, n. 9, p. 1073–1076, 1985.
- EPSTEIN, L; NICHOLSON, R. N. Adhesion of spores and hyphae to plant surfaces. In CARROLL, G. C.; TUDZYNSKI P. **The Mycota. V. Plant Relationships**. Berlin/Heidelberg: Springer Verlag, p. 11–25, 1997.
- FAN, L. et al. Endocytosis and its regulation in plants. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 6, p. 388–397, 2015.

- FERNANDES, L. S. et al. Mapping of a Major QTL for Ceratocystis Wilt Disease in an F1 Population of *Theobroma cacao*. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1–15, 2018.
- FIRMINO, A. C. et al. First report of *Ceratocystis fimbriata* causing fruit-rot of *Passiflora edulis* in Brazil. **New Disease Reports**, v. 27, p. 4, 2013.
- FIRMINO, A. C.; TOZZE JUNIOR, H. J.; FURTADO, E. L. First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt in *Tectona grandis* in Brazil. **New Disease Reports**, Piracicaba, Sp, v. 1, n. 25, p.24-24, 2012.
- FISTER, A. S. et al. Two *Theobroma cacao* genotypes with contrasting pathogen tolerance show aberrant transcriptional and ROS responses after salicylic acid treatment. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 20, p. 6245–6258, 2015.
- FISTER, A. S. et al. *Theobroma cacao* L. pathogenesis-related gene tandem array members show diverse expression dynamics in response to pathogen colonization. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–16, 2016.
- FLOR, H. H. Current Status of the Gene-for-Gene. **Annual Review of Phytopathology**, v. 9, n. 1, p. 275–296, 1971.
- FRANCISCO, L. Pesquisa lança nova arma para combater fungo do cacau. **Folha de São Paulo**, Salvador, 1995. Disponível em: <<https://www1.folha.uol.com.br/>>. Acesso em: 04. ago. 2019.
- FRANCO-ZORRILLA, J. M.; SOLANO, R. Identification of plant transcription factor target sequences. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1860, n. 1, p. 21–30, 2017.
- FRISO, G.; VAN WIJK, K. J. Posttranslational protein modifications in plant metabolism. **Plant Physiology**, v. 169, n. 3, p. 1469–1487, 2015.
- GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: What relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 402, p. 1445–1454, 2004.
- GAGUANCELA, O. A. et al. The IRE1/bZIP60 pathway and bax inhibitor 1 suppress systemic accumulation of potyviruses and potexviruses in arabidopsis and nicotiana benthamiana plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 29, n. 10, p. 750–766, 2016.
- GAO, M. et al. Regulation of Cell Death and Innate Immunity by Two Receptor-like Kinases in Arabidopsis. **Cell Host and Microbe**, v. 6, n. 1, p. 34–44, 2009.
- GAO, Y. L. et al. Tobacco serine/threonine protein kinase gene NrSTK enhances black shank resistance. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 16415–16424, 2015.
- GARDEA, A. A. et al. Cacao (*Theobroma cacao* L.). **Exotic fruits**, p. 69–76, 2018.
- GASTEIGER, E. et al. **Protein identification and analysis tools on the ExPASy server**. Springer, 2005.

- GESTEIRA, A. S. et al. Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora perniciosa*. **Annals of Botany**, v. 100, n. 1, p. 129–140, 2007.
- GIRALDO, E. A. La llaga macana del tronco del cacao. **Acta agronomica**, v. 7, n. 1, p. 71–103, 1957.
- GÖHRE, V.; ROBATZEK, S. Breaking the Barriers: Microbial Effector Molecules Subvert Plant Immunity. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, n. 1, p. 189–215, 2008.
- GOVRIN, E. M.; LEVINE, A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. **Current Biology**, v. 10, n. 13, p. 751–757, 2000.
- GUERRA-GUIMARÃES, L. et al. Protein dynamics in the plant extracellular space. **Proteomes**, v. 4, n. 3, p. 1–19, 2016.
- GUPTA, R.; JUNG, E.; BRUNAK, S. **Prediction of N-glycosylation sites in human proteins**, 2004.
- HADWIGER, L. A. Pea-*Fusarium solani* interactions contributions of a system toward understanding disease resistance. **Phytopathology**, v. 98, n. 4, p. 372–379, 2008.
- HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L. Black rot in lettuce: a new disease caused by *Ceratocystis fimbriata* in hydroponic culture in Brazil. **Plant Pathology**, v. 55, n. 2, p. 300–300, 2006.
- HAMAMOUCHE, N. et al. The interaction of the novel 30C02 cyst nematode effector protein with a plant β -1,3-endoglucanase may suppress host methylation and chromatin patterning defence to promote parasitism. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 10, p. 3683–3696, 2012.
- HARDY, F. Fungus diseases of cacao and their control. In: Hardy, F. (Ed.) **Cacao Manual**, InterAmerican Institute of Agricultural Sciences, Turrialba, Costa Rica, p. 242–245, 1960.
- HARKENRIDER, M. et al. Overexpression of Rice Wall-Associated Kinase 25 (OsWAK25) alters resistance to bacterial and fungal pathogens. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2016.
- HARRINGTON, T. C. The genus *Ceratocystis*. Where does the oak wilt fungus fit? In: BILLINGS, R. F.; APPEL, D. N. **The Proceedings of the 2nd National Oak Wilt Symposium**. Austin, Tx: Texas Forest Service Publication, p. 21–35, 2009.
- HEJINE, G. von. The Signal Peptide. **J. Membrane Biol.**, v. 115, p. 195–201, 1990.
- HINZ, M. et al. Arabidopsis RAP2.2: An ethylene response transcription factor that is important for hypoxia survival. **Plant Physiology**, v. 153, n. 2, p. 757–772, 2010.
- HOSMANI, P. S. et al. Dirigent domain-containing protein is part of the machinery required for formation of the lignin-based Casparian strip in the root. **Proceedings of**

- the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 110, n. 35, p. 14498–14503, 2013.
- HU, B. et al. GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server. **Bioinformatics**, v. 31, n. 8, p. 1296–1297, 2015.
- HUANG, P. et al. Overexpression of L-type lectin-like protein kinase 1 confers pathogen resistance and regulates salinity response in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, v. 203–204, p. 98–106, 2013.
- HUANG, S. et al. Comparative genomics enabled the isolation of the R3a late blight resistance gene in potato. **Plant Journal**, v. 42, n. 2, p. 251–261, 2005.
- HÜCKELHOVEN, R. BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. **Apoptosis**, v. 9, n. 3, p. 299–307, 2004.
- IBGE. Produção Agrícola Municipal, 2019. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 06. out. 2019.
- ICCO. Production of cocoa beans, 2019. Disponível em: <<https://www.icco.org/>>. Acesso em: 06. out. 2019.
- IDÄNHEIMO, N. et al. The *Arabidopsis thaliana* cysteine-rich receptor-like kinases CRK6 and CRK7 protect against apoplastic oxidative stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 445, n. 2, p. 457–462, 2014.
- ISHIKAWA, T. et al. Bax inhibitor-1: A highly conserved endoplasmic reticulum-resident cell death suppressor. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, n. 8, p. 1271–1278, 2011.
- ISHIKAWA, T.; UCHIMIYA, H.; KAWAI-YAMADA, M. **The role of plant bax inhibitor-1 in suppressing H₂O₂-induced cell death**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 527
- ITON, E. F. Ceratostomella wilt in cacao in Trinidad. In InterAmerican Cacao Conference, Port of Spain, Trinidad, **Proceedings**, p. 201–204, 1960.
- ITON, E. F.; CONWAY, G. R. Studies on a wilt disease of cacao at River State. III. Some aspects of the biology and habits of *Xyleborus* spp. and their relation to disease transmission. **Report Cacao Research**, v. 45, p. 59-65, 1961.
- JELIHOVSCHI, E.; FARIA, J. C.; ALLAMAN, I. B. ScottKnott: A Package for Performing the Scott-Knott Clustering Algorithm in R. **TEMA (São Carlos)**, v. 15, n. 1, p. 003, 2014.
- JONES, E. B. G. Fungal adhesion. **Mycological Research**, v. 98, n. 9, p. 961–981, 1994.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006.
- JONES, M. J.; EPSTEIN, L. Adhesion of macroconidia to the plant surface and virulence of *Nectria haematococca*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 3772–3778, 1990.

- JONES, P. et al. InterProScan 5: Genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1236–1240, 2014.
- JUN, Z. et al. Overexpression of GbRLK, a putative receptor-like kinase gene, improved cotton tolerance to Verticillium wilt. **Scientific Reports**, v. 5, n. June, p. 1–12, 2015.
- KAJITANI, Y.; MASUYA, H. *Ceratocystis ficicola* sp. nov., a causal fungus of fig canker in Japan. **Mycoscience**, v. 52, n. 5, p. 349–353, 2011.
- KANG, C. H. et al. AtBAG6, a novel calmodulin-binding protein, induces programmed cell death in yeast and plants. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, n. 1, p. 84–95, 2006.
- KATAGIRI, F.; TSUDA, K. Understanding the Plant Immune System. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 23, n. 12, p. 1531–1536, 2010.
- KAWAI-YAMADA, M.; OHORI, Y.; UCHIMIYA, H. Dissection of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 Suppressing Bax-, Hydrogen Peroxide-, and Salicylic Acid-Induced Cell Death. **Plant Cell**, v. 16, n. 1, p. 21–32, 2004.
- KIEMER, L.; BENDTSEN, J. D.; BLOM, N. NetAcet: prediction of N-terminal acetylation sites. v. 21, n. 7, p. 1269–1270, 2005.
- KIM, N. Y.; JANG, Y. J.; PARK, O. K. AP2/ERF family transcription factors ORA59 and RAP2.3 interact in the nucleus and function together in ethylene responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 871, n. November, p. 1–12, 2018.
- KIRKWOOD, J. et al. Using isoelectric point to determine the pH for initial protein crystallization trials. **Bioinformatics**, v. 31, n. 9, p. 1444–1451, 2015.
- LEGAVRE, T. et al. Identification of *Theobroma cacao* genes differentially expressed during *Phytophthora megakarya* infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 92, p. 1–13, 2015.
- LANFERMEIJER, F. C. et al. Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene Tm-22 from *Lycopersicon esculentum*. **Plant Molecular Biology**, v. 52, n. 5, p. 1037–1049, 2003.
- LANAUD, C. et al. A meta-QTL analysis of disease resistance traits of *Theobroma cacao* L. **Molecular Breeding**, v. 24, n. 4, p. 361–374, 2009.
- LAWRENCE, J. S.; CAMPÊLO, A. M. F. L.; FIGUEIREDO, J. M. Enfermidades do cacauzeiro. III Doenças fúngicas vasculares e radiculares. **Agrotrópica**, v. 3, n.2, p. 65–73, 1991.
- LEE, H. A.; YEOM, S. I. Plant NB-LRR proteins: Tightly regulated sensors in a complex manner. **Briefings in Functional Genomics**, v. 14, n. 4, p. 233–242, 2015.
- LEWIS, J. D. et al. Allele-specific virulence attenuation of the *Pseudomonas syringae* HopZ1a type III effector via the Arabidopsis ZAR1 resistance protein. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 4, p. 1–14, 2010.

- LIANG, X.; ZHOU, J.-M. Receptor-Like Cytoplasmic Kinases: Central Players in Plant Receptor Kinase-Mediated Signaling. **Annual Review of Plant Biology**, v. 69, n. 1, p. 267–299, 2018.
- LI, B. et al. The characteristics of Bax inhibitor-1 and its related diseases. **Current molecular medicine**, v. 14, n. 5, p. 603–15, 2014.
- LI, B. et al. Transcriptional Regulation of Pattern-Triggered Immunity in Plants. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 641–650, 2016.
- LI, J.; BRADER, G.; PALVA, E. T. Kunitz trypsin inhibitor: An antagonist of cell death triggered by phytopathogens and fumonisins B1 in Arabidopsis. **Molecular Plant**, v. 1, n. 3, p. 482–495, 2008.
- LI, Q. et al. CsWAKL08, a pathogen-induced wall-associated receptor-like kinase in sweet orange, confers resistance to citrus bacterial canker via ROS control and JA signaling. **Horticulture Research**, v. 7, n. 1, 2020.
- LIN, W. et al. Tyrosine phosphorylation of protein kinase complex BAK1/BIK1 mediates Arabidopsis innate immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 9, p. 3632–3637, 2014.
- LISAK, D. A. et al. The transmembrane Bax inhibitor motif (TMBIM) containing protein family: Tissue expression, intracellular localization and effects on the ER CA²⁺-filling state. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1853, n. 9, p. 2104–2114, 2014.
- LITHOLDO, C. G. et al. Differential expression of jasmonate biosynthesis genes in cacao genotypes contrasting for resistance against *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 10, p. 1747–1759, 2015.
- LIU, P. L. et al. Origin and diversification of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) genes in plants. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, n. 1, p. 1–16, 2017.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LEE, H. A.; YEOM, S. I. Plant NB-LRR proteins: Tightly regulated sensors in a complex manner. **Briefings in Functional Genomics**, v. 14, n. 4, p. 233–242, 2015.
- LO PRESTI, L. et al. Fungal Effectors and Plant Susceptibility. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, n. 1, p. 513–545, 2015.
- LUND, S. T.; STALL, R. E.; KLEE, H. J. Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. **Plant Cell**, v. 10, n. 3, p. 371–382, 1998.
- MACKO, V. et al. Self-inhibitor of bean rust uredospores-Methyl 3,4-dimethoxycinnamate. **Science**, v. 170, n. 3957, p. 539–540, 1970.

- MAHDAVI, F.; SARIAH, M.; MAZIAH, M. Expression of rice thaumatin-like protein gene in transgenic banana plants enhances resistance to *Fusarium wilt*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 4, p. 1008–1019, 2012.
- MAIDMENT, J. M. et al. Matrix metalloproteinase homologues from *Arabidopsis thaliana*. Expression and activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 49, p. 34706–34710, 1999.
- MALAGUTI, G. La necrosis del tronco del cacao en Venezuela. **Agronomia Tropical**, Venezuela, v. 4, n. 5, p.207-226, 1956.
- MATHER, K.; JINKS, J. L. Introdução a genética biométrica. São Paulo: **Sociedade Brasileira de Genética**, 1984. 242 p.
- MATSUMURA, H. et al. Overexpression of Bax inhibitor suppresses the fungal elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells. **Plant Journal**, v. 33, n. 3, p. 425–434, 2003.
- MCCORMACK, M. E. et al. Making the right connections: Network biology and plant immune system dynamics. **Current Plant Biology**, v. 5, p. 2–12, 2016.
- MEINKE, D. W. et al. *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. **Science**, v. 282, n. 5389, 1998.
- MINSAVAGE, G. V. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - pepper interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 3, n.1, p. 41-47, 1990.
- MIRMAJLESSI, S. M. et al. Real-time PCR applied to study on plant pathogens: Potential applications in diagnosis – A review. **Plant Protection Science**, v. 51, n. 4, p. 177–190, 2015.
- MISRA, R. C. et al. A thaumatin-like protein of *Ocimum basilicum* confers tolerance to fungal pathogen and abiotic stress in transgenic *Arabidopsis*. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–14, 2016.
- MIZUTAKA, S.; YAKUBO, K. Robustness of scale-free networks to cascading failures induced by fluctuating loads. **Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics**, v. 92, n. 1, p. 1–8, 2015.
- MOLANO, E. P. L. et al. *Ceratocystis cacaofunesta* genome analysis reveals a large expansion of extracellular phosphatidylinositol-specific phospholipase-C genes (PI-PLC). **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 1–24, 2018.
- MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. **Properties of Analytes and Matrices Determining HPLC Selection**, Elsevier, 2017.
- MONAGHAN, J.; ZIPFEL, C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 4, p. 349–357, 2012.
- MOREL, J. B.; DANGL, J. L. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. **Cell Death and Differentiation**, v. 4, n. 8, p. 671–683, 1997.

MORGAN-JONES, G. *Ceratocystis fimbriata*. **CMI. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria**, v. 141. p. 2, 1967.

MORGAN, P. W.; DREW, M. C. Ethylene and plant responses to stress. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 3, p. 620–630, 1997.

MONTEIRO, W. R.; PIRES, J. L.; PINTO, L. R. M. Variedade Theobahia. **Informação e Difusão Nova Série**, v. 1, p. 1–2, 1995.

MOTAMAYOR, J. et al. The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. **Genome Biology**, v. 14, n. 6, p. r53, 2013.

MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Ethylene response factors: A key regulatory hub in hormone and stress signaling. **Plant Physiology**, v. 169, n. 1, p. 32–41, 2015.

MUNIS, M. F. H. et al. A thaumatin-like protein gene involved in cotton fiber secondary cell wall development enhances resistance against *Verticillium dahliae* and other stresses in transgenic tobacco. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 1, p. 38–44, 2010.

MYCOBANK. Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks, 2019. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/>>. Acesso em: 04. ago. 2019.

NAGANO, M. et al. Arabidopsis sphingolipid fatty acid 2-hydroxylases (AtFAH1 and AtFAH2) are functionally differentiated in fatty acid 2-hydroxylation and stress responses. **Plant Physiology**, v. 159, n. 3, p. 1138–1148, 2012.

NAIR, R.; ROST, B. Mimicking cellular sorting improves prediction of subcellular localization. **Journal of Molecular Biology**, v. 348, n. 1, p. 85–100, 2005.

NAKAYAMA, L.H.I; SOARES, M.K.M; APPEZZATO-DA-GLORIA, B. Contribuição ao estudo anatômico da folha e do caule do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.). **Sci. agric.**, Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 73, Jan. 1996.

NICAISE, V.; ROUX, M.; ZIPFEL, C. Recent Advances in PAMP-Triggered Immunity against Bacteria: Pattern Recognition Receptors Watch over and Raise the Alarm. **Plant Physiology**, v. 150, n. 4, p. 1638–1647, 2009.

NICHOLSON, R. L.; EPSTEIN, L. Adhesion of Fungi to the Plant Surface: Prerequisite for Pathogenesis. In: **The fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals**. [s.l: s.n.]p. 3–19.

OLIVEIRA, B. F. de et al. Identificação de fontes de resistência a *Ceratocystis cacaofunesta* em mudas de cacaueiro. **Agrotrópica**, v. 21, n. 1, p. 83–88, 2009.

OLIVEIRA, L. S. S. et al. Species or Genotypes? Reassessment of Four Recently Described Species of the Ceratocystis Wilt Pathogen, *Ceratocystis fimbriata*, on *Mangifera indica*. **Phytopathology**, v. 105, n. 9, p. 1229–1244, 2015.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. **Identificação e manejo das principais doenças do cacaueiro no Brasil**. Ilhéus, CEPLAC/ CEPEC/SEFIT, 2005. 132p.

- OLIVEIRA, M. L. et al. Murcha de Ceratocystis, nova doença do cupuaçuzeiro. **Agrotrópica**, v. 25, n. 1, p. 33–38, 2013.
- OLIVEIRA, M. L. Doenças do cacaueiro. In: SODRÉ, George Andrade. **Cultivo do cacaueiro no estado da Bahia**. Ilhéus, Ba: Mapa/Ceplac/Cepec, 2017. p. 67-104.
- ONYILE, A. B.; EDWARDS, H. H.; GESSNER, R. V. Adhesive Material of the Hyphopodia of *Buergeriella spartinae*. **Mycologia**, v. 74, n. 5, p. 777–784, 1982.
- ORI, N. et al. The I2C Family from the Wilt Disease Resistance Locus I2 Belongs to the Nucleotide Binding, Leucine-Rich Repeat Superfamily of Plant Resistance Genes. **The Plant Cell**, v. 9, p. 521–532, 1997.
- OWCZARZY, R. et al. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. **Nucleic acids research**, v. 36, n. Web Server issue, p. 163–169, 2008.
- PALMA, K. et al. Regulation of plant innate immunity by three proteins in a complex conserved across the plant and animal kingdoms. **Genes and Development**, v. 21, n. 12, p. 1484–1493, 2007.
- PARK, J. E. et al. An Arabidopsis GH3 gene, encoding an auxin-conjugating enzyme, mediates phytochrome B-regulated light signals in hypocotyl growth. **Plant and Cell Physiology**, v. 48, n. 8, p. 1236–1241, 2007.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência à doenças. In: LUZ, W.C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Vol. II. Passo Fundo, RAPP, p.1-52. 1994.
- PASSARINHO, P. A.; DE VRIES, S. C. Arabidopsis Chitinases : a Genomic Survey . **The Arabidopsis Book**, v. 1, p. e0023, 2002.
- PEREIRA, J. L. et al. La primera aparición de la “escoba de bruja” en la principal área productora de cacao del Brasil. **Turrialba (IICA)**, v. 39, n.7, p. 459–461, 1989.
- PETRE, B. et al. Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. **BMC Plant Biology**, v. 11, 2011.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.
- PINHEIRO, T. T. et al. Establishing references for gene expression analyses by RT-qPCR in *Theobroma cacao* tissues. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 3291–3305, 2011.
- PEREIRA, W. et al. *Citrus reticulata* CrRAP2.2 Transcriptional Factor Shares Similar Functions to the Arabidopsis Homolog and Increases Resistance to *Xylella fastidiosa*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 33, n. 3, p. 519–527, 2020.
- PETROVSKÁ, B.; ŠEBELA, M.; DOLEŽEL, J. Inside a plant nucleus: Discovering the proteins. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 6, p. 1627–1640, 2015.

- POKOU, D. N. et al. Resistant and susceptible cacao genotypes exhibit defense gene polymorphism and unique early responses to *Phytophthora megakarya* inoculation. **Plant Molecular Biology**, v. 99, n. 4–5, p. 499–516, 2019.
- QI, J. et al. Apoplastic ROS signaling in plant immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 38, p. 92–100, 2017.
- RAJAM, M. V. et al. Thaumatin gene confers resistance to fungal pathogens as well as tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 1, p. 135–141, 2007.
- RANGARAJAN, N.; KULKARNI, P.; HANNENHALLI, S. Evolutionarily Conserved Network Properties of Intrinsically Disordered Proteins. **PLoS ONE**, v. 10, p. 1–16, 2015.
- REEM, N. T. et al. Comprehensive transcriptome analyses correlated with untargeted metabolome reveal differentially expressed pathways in response to cell wall alterations. **Plant Molecular Biology**, v. 96, n. 4–5, p. 509–529, 2018.
- RICKARD, J. E.; GAHAN, P. B. The Development of Occlusions in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Root Xylem Vessels. **Annals of Botany**, v. 52, n. 6, p. 811–821, 1983.
- RINCONES, J. et al. Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the witches' broom pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 7, p. 891–908, 2008.
- ROCHA, L. B. **A região cacaueira da Bahia - dos coronéis à vassoura-de-bruxa**: saga, percepção, representação. Ilhéus, Editus, 2008. 255 p.
- RORER, J.B. Enfermedades y plagas de cacao en el Ecuador y métodos modernos apropiados al cultivo de cacao. Asociación de Agricultores del Ecuador. 1918. 80p.
- ROSE, A. B. et al. Intron sequences that stimulate gene expression in Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, v. 92, n. 3, p. 337–346, 2016.
- ROUX, J. et al. Ceratocystis species infecting stem wounds on *Eucalyptus grandis* in South Africa. **Plant Pathology**, v. 53, n. 4, p. 414–421, 2004.
- RSTUDIO TEAM (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. URL <http://www.rstudio.com/>.
- SAIJO, Y. ER quality control of immune receptors and regulators in plants. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 716–724, 2010.
- SAIJO, Y.; LOO, E. P. I.; YASUDA, S. Pattern recognition receptors and signaling in plant-microbe interactions. **Plant Journal**, v. 93, n. 4, p. 592–613, 2018.
- SALGUERO-LINARES, J.; COLL, N. S. Plant proteases in the control of the hypersensitive response. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 7, p. 2087–2095, 2019.

- SANCHES, C. L. G. et al. Assessment of resistance to *Ceratocystis cacaofunesta* in cacao genotypes. **European Journal of Plant Pathology**, v. 122, n. 4, p. 517–528, 2008.
- SANTALUCIA, J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 4, p. 1460–1465, 1998.
- SANTOS, E. S. L. et al. Genetic structure and molecular diversity of cacao plants established as local varieties for more than two centuries: The genetic history of cacao plantations in Bahia, Brazil. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–18, 2015.
- SANTOS, R. M. F. **Estudo genético, molecular e histopatológico da interação cacau-*Ceratocystis cacaofunesta***. 2012. 168 f. Tese (Doutorado) - Curso de Genética e Biologia Molecular, Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Ba, 2012. Cap. 4.
- SANTOS, R. M. F. et al. Identification of quantitative trait loci linked to *Ceratocystis* wilt resistance in cacao. **Molecular Breeding**, v. 30, n. 4, p. 1563–1571, 2012.
- SANTOS, R. M. F. et al. Kinetics and Histopathology of the Cacao-*Ceratocystis cacaofunesta* Interaction. **Tropical Plant Biology**, v. 6, n. 1, p. 37–45, 2013a.
- SANTOS, R. M. F. et al. Identification, characterization and mapping of EST-derived SSRs from the cacao-*Ceratocystis cacaofunesta* interaction. **Tree Genetics and Genomes**, v. 9, n. 1, p. 117–127, 2013b.
- SCHEER, J. M.; RYAN, C. A. The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 14, p. 9585–9590, 2002.
- SCHUURMANS STEKHOVEN, F. M. A. H.; GORISSEN, M. H. A. G.; FLIK, G. The isoelectric point, a key to understanding a variety of biochemical problems: A minireview. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 1–8, 2008.
- SCOTTON, D. C. et al. Expression of the *Theobroma cacao* Bax-inhibitor-1 gene in tomato reduces infection by the hemibiotrophic pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 8, p. 1101–1112, 2017.
- SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal Proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2883–2894, 2001.
- SENEVIRATNE, H. K. et al. Non-host disease resistance response in pea (*Pisum sativum*) pods: Biochemical function of DRR206 and phytoalexin pathway localization. **Phytochemistry**, v. 113, p. 140–148, 2015.
- SEPHTON-CLARK, P. C. S.; VOELZ, K. Spore Germination of Pathogenic Filamentous Fungi. In: **Advances in Applied Microbiology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. 102p. 117–157.

- SCHESTIBRATOV, K. A.; DOLGOV, S. V. Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea*. **Scientia Horticulturae**, v. 106, n. 2, p. 177–189, 2005.
- SHAO, Z. Q. et al. Large-scale analyses of angiosperm nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes reveal three anciently diverged classes with distinct evolutionary patterns. **Plant Physiology**, v. 170, n. 4, p. 2095–2109, 2016.
- SHIU, S. H.; BLEECKER, A. B. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. **Science's STKE: signal transduction knowledge environment**, v. 2001, n. 113, 2001.
- SILVA, R. J. S.; MICHELI, F. RRGPredictor, a set-theory-based tool for predicting pathogen-associated molecular pattern receptors (PRRs) and resistance (R) proteins from plants. **Genomics**, v. 112, n. 3, p. 2666–2676, 2020.
- SILVA, S.D.V.M.; E.D.M.N LUZ. *Ceratocystis fimbriata* em cacaueiros das variedades Theobahia cultivadas na Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25 (Suplemento), 424p, 2000.
- SILVA, S. D. V. M.; PAIM, M. C.; CASTRO, W. M. Cacau “Jaca” resistente a *Ceratocystis fimbriata* na região cacaueira da Bahia, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 538–540, 2004.
- SELS, J. et al. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 941–950, 2008.
- SOANES, D. M. et al. Genome-wide transcriptional profiling of appressorium development by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, 2012.
- SOUZA, C. A. S.; DIAS, L. A. S. Melhoramento ambiental e socioeconômico In.: DIAS, L. A. S. (Ed.) **Melhoramento genético do cacaueiro**. Viçosa, FUNAPE: UFG, p.1-47, 2001.
- STAKMAN, E. C. Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. **Journal of Agricultural Research**, v. IV, n. 3, p. 193–200, 1915.
- STANGARLIN, J. R et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agria Paranaensis**, v. 10, p. 18–46, 2011.
- STEPANOVA, A. N.; ALONSO, J. M. Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 5, p. 548–555, 2009.
- SZKLARCZYK, D. et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D607–D613, 2019.
- STONE, J. M. et al. Interaction of a protein phosphatase with an Arabidopsis serine-threonine receptor kinase. **Science**, v. 266, n. 5186, p. 793–795, 1994.

TAKAHASHI, F. et al. Calmodulin-Dependent Activation of MAP Kinase for ROS Homeostasis in Arabidopsis. **Molecular Cell**, v. 41, n. 6, p. 649–660, 2011.

TAMELING, W. I. L.; JOOSTEN, M. H. A. J. The diverse roles of NB-LRR proteins in plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 71, n. 4–6, p. 126–134, 2007.

TARIGAN, M. et al. A new wilt and die-back disease of *Acacia mangium* associated with *Ceratocystis manginecans* and *C. acaciivora* sp. nov. in Indonesia. **South African Journal of Botany**, v. 77, n. 2, p. 292–304, 2011.

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

The Nature Conservancy, 2017. Disponível em: <<https://www.tnc.org.br>>. Acesso em: 06. out. 2019.

THORNTON, B.; BASU, C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 39, n. 2, p. 145–154, 2011.

TOBIAS, D. J. et al. Co-bombardment, integration and expression of rice chitinase and thaumatin-like protein genes in barley (*Hordeum vulgare* cv. Conlon). **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 5, p. 631–639, 2007.

TOGNOLLI, M. et al. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in Arabidopsis thaliana. **Gene**, v. 288, n. 1–2, p. 129–138, 2002.

TSUDA, K.; SOMSSICH, I. E. Transcriptional networks in plant immunity. **New Phytologist**, v. 206, n. 3, p. 932–947, 2015.

TUMURA, K. G.; PIERI, C. De; FURTADO, E. L. Murcha de ceratocystis em eucalipto. **Summa Prytopathol**, v. 38, n. 1, p. 54–60, 2012.

UNO, H. et al. Enhancement of cell wall protein SRPP expression during emergent root hair development in Arabidopsis. **Plant Signaling and Behavior**, v. 12, n. 10, 2017.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 71–74, 2007.

VALDETARO, D. C. O. F. et al. Genetic variation, morphology and pathogenicity of *Ceratocystis fimbriata* on *Hevea brasiliensis* in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, n. 3, p. 184–192, 2015.

VALMONTE, G. R. et al. Calcium-dependent protein kinases in plants: Evolution, expression and function. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 3, p. 551–569, 2014.

VAN DER BURGH, A. M. et al. Kinase activity of SOBIR1 and BAK1 is required for immune signalling. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 3, p. 410–422, 2019.

VAN DER HOORN, R. A. L.; KAMOUN, S. From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. **The Plant Cell**, v. 20, n. 8, p. 2009–2017, 2008.

- VANDERMOLEN, G. E. et al. Pathogen-induced vascular gels: Ethylene as a host intermediate. **Physiologia Plantarum**, v. 59, n. 4, p. 573–580, 1983.
- VAN LONG, N. N. et al. Temperature, water activity and pH during conidia production affect the physiological state and germination time of *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 151–160, 2017.
- VAN WYK, M. et al. New *Ceratocystis* species infecting coffee, cacao, citrus and native trees in Colombia. **Fungal Diversity**, v. 40, p. 103–117, 2010.
- VELAZHAHAN, R. et al. Induction of thaumatin-like proteins in *Rhizoctonia solani*-infected. **Physiologia Plantarum**, v. 102, p. 21–28, 1998.
- VELLO, F.; GARCIA, J. R. Características das principais variedades de cacau cultivadas na Bahia. **Revista Theobroma**, v.1, p. 3-10, 1971.
- VICENTE, J. et al. Distinct branches of the N-end rule pathway modulate the plant immune response. **New Phytologist**, v. 221, n. 2, p. 988–1000, 2019.
- WALKER, J. C. Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. **Plant Molecular Biology**, v. 26, p. 1599–1609, 1994.
- WANG, K. L. C.; LI, H.; ECKER, J. R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **Plant Cell**, v. 14, n. SUPPL., p. 131–152, 2002.
- WANG, Y.; FRISTENSKY, B. Transgenic canola lines expressing pea defense gene DRR206 have resistance to aggressive blackleg isolates and to *Rhizoctonia solani*. **Molecular Breeding**, v. 8, n. 3, p. 263–271, 2001.
- WATANABE, N.; LAM, E. Arabidopsis Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. **Plant Journal**, v. 45, n. 6, p. 884–894, 2006.
- WATANABE, N.; LAM, E. Bax inhibitor-1, a conserved cell death suppressor, is a key molecular switch downstream from a variety of biotic and abiotic stress signals in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 7, p. 3149–3167, 2009.
- WILLIAMS, R. W.; WILSON, J. M.; MEYEROWITZ, E. M. A possible role for kinase-associated protein phosphatase in the Arabidopsis CLAVATA1 signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 19, p. 10467–10472, 1997.
- WIN, J. et al. Effector biology of plant-associated organisms: Concepts and perspectives. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 77, p. 235–247, 2012.
- WHITHAM, S. et al. The Product of the Tobacco Mosaic Virus Resistance Gene N: Similarity to Toll and the Interleukin-1 Receptor. **Cell**, v. 78, p. 1101–1115, 1994.
- WITHERS, J.; DONG, X. Post-translational regulation of plant immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 38, p. 124–132, 2017.
- WOLF, S. Plant cell wall signalling and receptor-like kinases. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 4, p. 471–492, 2017.

- WORLD COCOA FOUNDATION (2014). Disponível em: <<https://www.worldcocoafoundation.org/>>. Acesso em: 06. out. 2019.
- WU, C.-H.; DEREVNINA, L.; KAMOUN, S. Receptor networks underpin plant immunity. **Science**, v. 360, n. 6395, p. 1300–1301, 2018.
- XU, G. et al. Plant Bax Inhibitor-1 interacts with ATG6 to regulate autophagy and programmed cell death. **Autophagy**, v. 13, n. 7, p. 1161–1175, 2017.
- XU, Q.; REED, J. C. Bax Inhibitor-1, a Mammalian Apoptosis Suppressor Identified by Functional Screening in Yeast. **Molecular Cell**, v. 1, p. 337–346, 1998.
- YADETA, K. A. et al. A cysteine-rich protein kinase associates with a membrane immune complex and the cysteine residues are required for cell death. **Plant Physiology**, v. 173, n. 1, p. 771–787, 2017.
- YAMAGUCHI, T. et al. Differences in the Recognition of Glucan Elicitor Signals between Rice and Soybean: β -Glucan Fragments from the Rice Blast Disease Fungus *Pyricularia oryzae* that Elicit Phytoalexin Biosynthesis in Suspension-Cultured Rice Cells. **The Plant Cell**, v. 12, n. 5, p. 817, 2007.
- YANG, X.; DENG, F.; RAMONELL, K. M. Receptor-like kinases and receptor-like proteins: Keys to pathogen recognition and defense signaling in plant innate immunity. **Frontiers in Biology**, v. 7, n. 2, p. 155–166, 2012.
- YOO, S. D.; CHO, Y.; SHEEN, J. Emerging connections in the ethylene signaling network. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 5, p. 270–279, 2009.
- YOSHIDA, S. et al. The Haustorium, a Specialized Invasive Organ in Parasitic Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 67, n. 1, p. 643–667, 2016.
- ZHANG, Y. et al. Expression analysis and functional characterization of a pathogen-induced thaumatin-like gene in wheat conferring enhanced resistance to *Puccinia triticina*. **Journal of Plant Interactions**, v. 12, n. 1, p. 332–339, 2017.
- ZHAO, S.; FERNALD, R. D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology**, v. 12, n. 8, p. 1047–64, out. 2005.
- ZHOU, B. et al. The genomic dynamics evolutionary mechanism of the Pi2/9 locus in rice. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 1, p. 63–71, 2007.
- ZHU, Q. et al. The Arabidopsis AP2 / ERF transcription factor RAP2 . 6 participates in ABA , salt and osmotic stress responses. **Gene**, v. 457, n. 1–2, p. 1–12, 2010.
- ZULAWSKI, M. et al. The Arabidopsis Kinome: Phylogeny and evolutionary insights into functional diversification. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, 2014.