UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ- UESC

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Mapeamento genético para resistência à *Phytophthora* spp. e identificação de proteínas do cacaueiro associadas à resistência a podridão-parda.

DANDARA BISPO OLIVEIRA

Ilhéus – Bahia - Brasil
Abril - 2024

DANDARA BISPO OLIVEIRA

Mapeamento genético para resistência à *Phytophthora* spp. e identificação de proteínas do cacaueiro associadas à resistência a podridão-parda.

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

Área de Concentração: Genética e Biologia Molecular

Ilhéus – Bahia - Brasil
Abril - 2024

DANDARA BISPO OLIVEIRA

Mapeamento genético para resistência à *Phytophthora* spp. e identificação de proteínas do cacaueiro associadas à resistência a podridão-parda.

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

Área de Concentração: Genética e Biologia Molecular

APROVADA: 30 de abril de 2024

Dr. Claúsio Melo (Masterfoods)

Dra. Dahyana Britto (Masterfoods)

Dra. Natasha Lopes

Dra. Fátima Alvim
(UESC- Orientadora)

O48 Oliveira, Dandara Bispo.
Mapeamento genético para resistência à Phytophthora spp. e identificação de proteínas do cacaueiro associadas à resistência a Podridão-parda / Dandara Bispo Oliveira. – Ilhéus, BA: UESC, 2024.
69f.: il.

Orientadora: Fátima Cerqueira Alvim
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – PPGGBM
Inclui referências.

1. Proteômica. 2. Mapeamento de QTL. 3. Genes . 4. Plantas – resistência a doenças e pragas. I. Título

CDD 572.86

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me capacitado para o desenvolvimento desse projeto. À minha família, meu noivo Bruno Duarte, minha mãe Marisa e meu pai Gilmar Oliveira, e a todos os amigos que fiz nessa caminhada, tanto na UESC como no MCCS.

Agradeço aos meus amigos de laboratório do MCCS, Jacimara, Lidiane, Ana Paula e Icaro, sem eles esse projeto não teria acontecido, agradeço a todos os ensinamentos e colaboração.

Agradeço ao Mars Centro de Ciência Mars do cacau (MARS), pela disponibilização do espaço, da equipe e incentivo e financiamento do projeto. À Universidade Estadual de Santa Cruz e ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do curso Mestrado.

Agradeço aos meus orientadores Dra. Fátima Alvim e Dr. Ronan Xavier, por acreditarem no meu trabalho e terem me dado todo o suporte e orientação para trilhar essa caminhada. Em especial ao meu coorientador Dr. Luciel Fernandes, por ter me abrilhantado com essa oportunidade de trabalhar com algo novo e desafiador, agradeço a confiança e disponibilidade.

Aos meus amigos de UESC, agradeço em especial a Grazi, minha amiga e parceira de *western blot*, que esteve comigo me dando forças nesses últimos meses de finalização de projeto.

Agradeço a toda equipe do MCCS desde a equipe de laboratório à equipe da agronomia e aos colaboradores de campo, que estiveram sempre disponíveis.

SUMÁRIO

RESUMO.....7

ABSTRACT.....8

1. **INTRODUÇÃO**.....9
2. **REVISÃO DE LITERATURA**.....11

2.1. *Theobroma cacao L.* e os Impactos de Fitopatógenos na Lavoura Cacaueira.....11

2.2. Gênero *Phytophthora* spp.....12

2.3. Epidemiologia e controle.....15

2.4. Mapeamento de QTLs para Resistência do Cacaueiro e a construção de mapas genéticos por meio de marcadores SNP's.....16

2.5. Caracterização proteômica e a interação planta-patógeno.....17

2.6. Indução de proteínas de defesa em plantas.....18

CAPÍTULO 1: Mapeamento genético para resistência à *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora theobromicola* e identificação de genes associadas à resistência do cacaueiro

3. **INTRODUÇÃO**.....21
4. **MATERIAL E MÉTODOS**.....22

3.1. Material vegetal e condições de cultivo.....23

3.2. Preparo do inóculo: *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora theobromicola*.....22

3.3. Inoculação realizada em campo e laboratório.....24

3.4. Mapa de ligação e mapeamento QTL.....25

3.5. Genes candidatos dentro das regiões QTL.....26

3.6. Análise de dados.....26

3.7. Associações haplótipo-fenótipo.....27

5. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**.....28

4.1. Seleção do estágio de maturação dos frutos para inoculação com *P. palmivora* e *P. theobromicola*.....28

4.2. Variação fenotípica.....32

4.3. Principais haplótipos que estão associados a resistência genética e seleção de genes candidatos.....33

4.4. Análise de QTL e Identificação de genes candidatos.....34
4.5. Identificação de regiões de recombinação.....39
6. CONCLUSÃO.....40
7. REFERÊNCIAS.....41
8. CAPÍTULO 2: Identificação de proteínas de resposta do *T. cacao* relacionadas com o mecanismo de defesa a *Phytophthora theobromicola*.
RESUMO.....47
ABSTRACT.....47
1. INTRODUÇÃO.....48
2. MATERIAL E MÉTODOS.....48
2.1. Material vegetal.....50
2.2. Inoculação em laboratório.....50
2.3. Armazenamento das amostras.....51
2.4. Extração das proteínas totais das amostras de cacau infectadas com *P. theobromicola*.....52
2.5. Quantificação de proteínas totais e eletroforese em SDS-PAGE.....53
2.6. Western Blot.....54
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....56
3.1. Perfil proteico das amostras de casca inoculadas e controle obtidos por meio de SDS-PAGE.....56
3.2. Análise do acúmulo proteico por Western Blot.....56
3.3. BiP.....57
3.4. ATP SINTASE.....59
3.5. Catalase (CAT) 61
3.6. PR2.....63
4. CONCLUSÃO.....65
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....66
6. REFERÊNCIAS.....67

OLIVEIRA, Dandara Bispo. Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus, abril de 2024. **Mapeamento genético para resistência à *Phytophthora* spp., e identificação de proteínas associadas à resistência a podridão-parda** Orientador: Dra. Fátima Cerqueira Alvim. Coorientadores: Dr. Ronan Xavier Corrêa e Dr. Luciel Fernandes

RESUMO

A podridão-parda, causada pelo oomiceto *Phytophthora*, é uma doença que afeta o cacaueiro, propiciada por fatores ambientais como umidade e temperatura. Este patógeno apresenta estruturas de resistência que favorecem sua manutenção no solo, permanecendo inativo até obter condições favoráveis para iniciar a infecção. A doença se instala com manchas arredondadas e amarronzadas, se desenvolvem rapidamente após a infecção. As medidas de controle existentes são pouco eficazes, sendo necessária a utilização de variedades resistentes, a melhor alternativa para a redução da incidência da doença. No presente estudo, uma população segregante F1 resultante do cruzamento entre os clones, TSH 1188 (mediamente resistente) e CCN 51 (resistente), foi objeto de estudo para avaliar os níveis de resistência de frutos aos patógenos *P. theobromicola* e *P. palmivora*, buscando identificar possíveis genes candidatos associados à resistência ao patógeno. O mapeamento de QTL identificou um efeito significativo no cromossomo IV e V, onde foram encontrados genes candidatos relacionados a mecanismos de defesa envolvidos nas interações planta-patógeno, como reconhecimento de efetores de patógenos, resposta de hipersensibilidade, morte celular programada, resposta de resistência sistêmica e respostas de defesa dependentes de fito-hormônios a infecções por patógenos. Esses genes presentes nos QTL mapeados são genes candidatos que podem estar relacionados com a resistência à podridão-parda e esse conhecimento permite definir melhores estratégias, para programas de melhoramento em todo o mundo, para facilitar a seleção assistida por marcadores. Análises proteômicas, realizadas com frutos infectados com *P. theobromicola*, revelaram que a abundância de proteínas sabidamente relacionadas com a resposta do cacau à infecção varia. Foram avaliadas proteínas do tipo chaperone molecular, detoxificadoras, como catalases, e enzimas participativas de rotas de resposta a estresse, como ATP-sintase. Além disso, avaliou-se o nível de PR2, uma proteína de resposta do tipo glucanase. Todas essas proteínas tiveram a abundância aumentada no cacau mediante o processo de infecção, sendo que o nível varia entre genótipos resistentes e susceptíveis. Nossos dados, em conjunto, auxiliam na compreensão da resposta do cacau ao *Phytophthora* spp e servem de base para programas de combate ao patógeno.

Palavras- chave: QTL; proteômica; genes de resistência

OLIVEIRA, Dandara Oliveira. Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus, abril de 2024. **Characterization of genetic mapping for resistance to *Phytophthora* spp., and identification of proteins associated with resistance to black pod.** Orientador: Dra. Fátima Cerqueira Alvim. Coorientadores: Dr. Ronan Xavier Corrêa e Dr. Luciel Fernandes

ABSTRACT

Black pod, caused by the oomycete *Phytophthora*, is a disease that affects cocoa trees, caused by environmental factors such as humidity and temperature. This pathogen has resistance structures that favor its maintenance in the soil, remaining inactive until favorable conditions are obtained to initiate infection. The disease sets in with rounded, brownish spots that develop rapidly after infection. Existing control measures are not very effective, requiring the use of resistant varieties, which is the best alternative for reducing the incidence of the disease. In the present study, a segregating F1 population resulting from the cross between the clones, TSH 1188 (moderately resistant) and CCN 51 (resistant), was the object of study to evaluate the levels of resistance of fruits to the pathogens *P. theobromicola* and *P. palmivora*, seeking to identify possible candidate genes associated with resistance to the pathogen. QTL mapping identified a significant effect on chromosome IV and V, where candidate genes related to defense mechanisms involved in plant-pathogen interactions, such as recognition of pathogen effectors, hypersensitivity response, programmed cell death, systemic resistance response, and phytohormone-dependent defense responses to pathogen infections, were found. These genes present in the mapped QTL are candidate genes that may be related to resistance to brown pod, and this knowledge allows defining better strategies for breeding programs worldwide to facilitate marker-assisted selection. Proteomic analyses performed on pods infected with *P. theobromicola* revealed that the abundance of proteins known to be related to the response of cocoa to infection varies. Molecular chaperone-type proteins, detoxifiers, such as catalases, and enzymes involved in stress response pathways, such as ATP synthase, were evaluated. In addition, the level of PR2, a glucanase-type response protein, was evaluated. All of these proteins increased in abundance in cocoa during the infection process, with levels varying between resistant and susceptible genotypes. Our data, taken together, help to understand the response of cocoa to *Phytophthora* spp and serve as a basis for programs to combat the pathogen.

Keywords: QTL; proteomics; resistance genes

1. INTRODUÇÃO

O cacaueiro (*Theobroma cacao L.*), é uma espécie dicotiledônea nativa das florestas tropicais úmidas do continente americano, pertencente à família Malvaceae, popularmente conhecida como cacaueiro. Essa árvore possui importância econômica significativa, sendo responsável pela produção de um dos produtos mais consumidos mundialmente, o chocolate. No entanto, sua produtividade é ameaçada por diferentes doenças que afetam significativamente o cacaueiro, como a podridão-parda e a vassoura-de-bruxa (Lessa et al., 2020).

A podridão-parda, causada pelo oomiceto *Phytophthora*, é a doença encontrada no cacaueiro à nível mundial, ocorrendo em todos os países produtores e causando perdas significativas, chegando a 30% dos frutos (Guest, 2007). Sua infecção provoca lesões em diferentes órgãos do cacaueiro, principalmente nos frutos, causando lesões de coloração amarronzada e arredondadas que se espalham facilmente dentro da lavoura e rapidamente sob condições de umidade e temperatura favoráveis.

O controle dessa doença requer a aplicação de tratos culturais e uso de defensivos, e como alternativa, o controle biológico. Uma alternativa de controle mais efetiva e econômica é a seleção genética de indivíduos resistentes (Nyassé et al., 2002). Várias populações têm sido caracterizadas para resistência a *Phytophthora* spp. com avaliações feitas no campo e inoculações artificiais de frutos e discos de folhas (Lessa et al., 2020).

Em estudos anteriores com a população F1 de mapeamento, MP01, foram identificados genes de resistência para várias doenças e outras características de importância econômica (Fernandes et al., 2018). No entanto, neste trabalho, ampliamos o mapa de ligação, utilizando 459 árvores para avaliar o nível de resistência, bem como inferir se a herdabilidade é conferida pelo genótipo materno (TSH 1188) ou paterno (CCN 51) (Royaert et al., 2016). Além disso, realizamos o estudo molecular, utilizando proteômica e genótipos selecionados para avaliar mais precisamente quais respostas de defesa estão sendo expressas e como essa informação pode contribuir positivamente para o programa de melhoramento genético do cacaueiro. Utilizamos não apenas a seleção assistida por marcadores, mas também técnicas de genética e biologia molecular para corroborar estudos realizados na população MP01 há mais de 10 anos.

Nossa hipótese baseia-se no fato de que a população MP01, originada do cruzamento entre TSH 1188 e CCN 51, conhecidos por sua resistência à *Phytophthora* spp., apresentará uma segregação significativa para esse traço de resistência. Assim, hipotetizamos que essa segregação é controlada por *Quantitative Trait Loci* (QTLs), os quais influenciam a expressão fenotípica da resistência a essa doença. Ao mapear esses QTLs em um mapa genético de alta resolução, utilizando marcadores moleculares do tipo polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs - *Single Nucleotide Polymorphisms*), esperamos identificar regiões genômicas associadas à resistência a *P. palmivora* e *P. theobromicola* no cacaueiro. Além disso, a análise de associação entre marcadores e fenótipos nos permitirá identificar genes candidatos que desempenham papéis-chave na resposta do cacau à infecção por podridão-parda.

Com o intuito de intensificar as pesquisas no reconhecimento de genótipos resistentes à podridão-parda, foram aplicadas análises moleculares relacionadas à proteômica neste estudo. A proteômica, que se concentra no estudo das proteínas, permite identificar proteínas de defesa da planta durante a interação planta-patógeno. Dessa forma, pode ser um aliado valioso, fornecendo subsídios importantes para a seleção assistida por marcadores, bem como para análises a nível molecular. O objetivo é identificar variedades de cacau mais resistentes à *Phytophthora* spp., contribuindo para o programa de melhoramento genético do cacaueiro.

Nesse contexto, nossos objetivos foram analisar os níveis de resistência dos genótipos FB 206 (susceptível), TSH 1188 (moderadamente resistente) e CCN 51 (resistente), utilizando a população segregante MP01 como objeto de estudo e duas espécies de *Phytophthora* spp. com diferentes níveis de agressividade. Além disso, buscamos identificar genes candidatos à resistência à podridão-parda, utilizando marcadores SNP, bem como possíveis proteínas relacionadas à defesa da planta contra o ataque do patógeno, que possam estar sendo transcritas por esses genes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Theobroma cacao* e os Impactos de Fitopatógenos na Lavoura Cacaueira

Theobroma cacao é uma planta da família Malvaceae, alógama, diploide (2n=20) (Argout et al., 2010), originária do Brasil, pertencente ao estado do Amazonas, na América do Sul (Motamayor et al., 2013). É popularmente conhecida pelo nome de cacaueiro ou pelo nome aplicado aos seus frutos, chamado cacau, essa cultura possui uma importância para a economia e rentabilidade mundial. As amêndoas, após o processo de fermentação, constituem a principal matéria-prima para a produção de chocolates, doces, manteiga de cacau e outros produtos destinados à indústria farmacêutica e cosmética (Souza et al., 2010). A cacauicultura contribui de forma direta na economia da África, América Latina e Ásia (Boza et al., 2012). O maior produtor mundial é a Costa do Marfim. Os Países Gana, Equador, Camarões e o Brasil, sétimo maior produtor, reúnem 88,4% da produção mundial ("Conheça os maiores produtores de cacau do mundo – Sistema FAEB", 2024).

O cacaueiro sempre foi alvo de diversas doenças que agridem de forma severa as plantas e, em especial, os frutos, provocando o aparecimento de doenças fúngicas. As principais doenças relacionadas ao cacaueiro são vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*), (Aime e Phillips-Mora, 2005), podridão-parda (*Phytophthora* spp., Brown et al., 2005), Monilíase (*Moniliophthora roreri*, Brown et al., 2005), mal-do-facão (*Ceratocystis cacaofunesta*, Engelbrecht e Harrigton, 2005).

A vassoura-de-bruxa chegou ao sul da Bahia no final da década de 1980 e marcou o início da crise da lavoura cacaueira na região, modificando assim todo o quadro econômico da Bahia. A podridão-parda ocorre mundialmente, sendo protagonista em diversos países produtores de cacau, atinge os frutos em diferentes estágios de maturação e chega a gerar em torno de 30% de perdas na lavoura cacaueira (Lessa et al., 2020). Outras doenças, como a monilíase e o mal do facão, também conhecido como mal-do-facão, são doenças que têm impacto direto na lavoura cacaueira.

A podridão-parda é constituída por um complexo de sete espécies do gênero *Phytophthora*. As que são encontradas no Brasil são *P. palmivora* (E.J. Butl) E. J Butler, *P. capsici* (Leonian e *P. hevean* A. J. Thomps.), *P. citrophthora* (R. E. S m & E. H. S.m.) Leonian e *P. theobromicola* (Decloquement, 2021). Diante da agressividade da doença, genótipos de cacau têm sido testados nos centros de pesquisa visando identificar aqueles que apresentam resistência à *Phytophthora* spp.

2.2 Gênero *Phytophthora* spp.

O gênero *Phytophthora* encontra-se entre seis das dez espécies de oomicetos consideradas mais importantes para a agricultura mundial, com destaque para *Phytophthora infestans* de Bary (Kamoun et al., 2015). Esta espécie teve importância na história por causar a epidemia da requeima da batata (*Solanum tuberosum L.)* na Irlanda entre os anos de 1845 e 1852. A epidemia impactou diretamente na fonte de subsistência da população, resultando em uma grande escassez de alimentos e, como consequência, milhares de mortos (Haverkort et al., 2009). Embora a epidemia tenha ocorrido há dois séculos passados, o patógeno atualmente ainda é um desafio para a agricultura, devido, entre outras características, à sua alta plasticidade genética (Haas et al., 2009).

Phytophthora spp. possuem seu ciclo de vida no solo e apresentam uma grande capacidade de sobrevivência nesse ambiente ao produzirem estruturas de resistência, conhecidas como clamidósporos. A maioria dessas espécies de *Phytophthora* spp. são polífagas, é raro alguma espécie apresentar especificidade para um hospedeiro ou para um pequeno grupo de hospedeiros. Em geral, já foram descritas cerca de 120 espécies fitopatogênicas de *Phytophthora* spp., que são agentes etiológicos de diversas doenças de plantas (Kroon et al., 2018).

A podridão-parda é uma doença que afeta diretamente a produção, atingindo não apenas os frutos, mas também outros órgãos da planta, como folhas e sementes, provocando o aparecimento de lesões que crescem rapidamente, prejudicando o desenvolvimento do órgão afetado. Diante disso, a podridão-parda causa perdas significativas na lavoura mundial, correspondendo a cerca de 20 a 30% da produção anual (Oliveira & Luz, 2005).

O cacaueiro é afetado por diferentes espécies de *Phytophthora* spp. Contudo, os sintomas de infecção são representados de forma similar nos órgãos afetados, no entanto, a intensidade e a agressividade variam, dependendo da espécie e da localização geográfica (Bailey& Meinhanrdt, 2016). Os maiores impactos causados por *Phytophthora* spp. no cacaueiro ocorrem nos frutos. O ataque do patógeno sobre o fruto pode ser observado em diferentes estágios de maturação. Inicialmente, as lesões nos frutos são pequenas, com 1 a 2 mm de diâmetro, arredondadas e castanho-escuras, tornando-se visíveis aproximadamente 30 horas após a infecção (Decloquement, 2021). Com 3 a 5 dias após a infecção, o oomiceto produz o esporângio, e sobre as lesões surge uma cobertura fina e esbranquiçada, formada por esporângio e micélio.

Os principais mecanismos de dispersão da doença são os ventos, que auxiliam na propagação dos esporângios do patógeno. As chuvas também fazem parte do processo de dispersão da doença. Quando os respingos de chuva caem ao solo, as estruturas de resistência do patógeno encontram uma forma de germinar e infectar os frutos da base da planta. A temperatura é um fator primordial, sendo necessário especificar que cada espécie de *Phytophthora* spp. apresenta sua temperatura ideal para ocorrer a germinação (Ho 1987; Erwin & Ribeiro, 1996; Yang et al., 2014). Para as espécies *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora theobromicola*, a temperatura deve estar entre 20 a 25 °C (Reis et., al 2023). A infecção nos frutos ocorre através dos oósporos ou zoósporos liberados dos esporângios, que necessitam de um filme de água na superfície do fruto para iniciar o processo de germinação e penetração. Após a invasão, o fungo atinge as sementes, tornando-as impróprias para a industrialização.

Quando os frutos estão no estágio imaturo, os sintomas mais comuns são manchas, enrugamentos e, posteriormente, escurecimento, podendo ser confundido com uma murcha fisiológica. Quando os frutos estão em estágio de maturação mais avançado, as amêndoas infectadas ainda são utilizadas durante o processo de comercialização, contudo, as amêndoas infectadas reduzem a qualidade do produto obtido (Oliveira & Luz, 2005; Silva Neto et al., 2001).

A podridão-parda pode atingir o tronco, ocasionada pela dispersão do micélio e das estruturas reprodutivas do fungo a partir de folhas e frutos infectados, apresentando sintomas de cancro. É possível observar na superfície do tronco manchas arredondadas e de coloração escura. Em estágios mais avançados, é possível observar exsudação e necrose do tecido infectado, podendo, em casos graves, matar a planta ao se aprofundar do lenho (Oliveira & Luz, 2005; Silva Neto et al., 2001).

O patógeno também infecta folhas e raízes, porém essa ação não se torna tão significativa como no ataque nos frutos. No entanto, ainda é necessário dar atenção aos órgãos doentes, pois esses são fontes de inóculo. Os sintomas em folhas aparecem em torno de 24 horas após a infecção, podendo ser observados pontos escuros com coloração castanha, que atingem rapidamente as nervuras e, posteriormente, necrosam, e a folha seca. O micélio é a estrutura reprodutiva do patógeno, e são produzidos na superfície da folha infectada (Luz et al., 2001).

No cacaueiro (*Theobroma cacao L.*), os danos são conhecidos e localizam-se mais na parte aérea da planta. *Phytophthora palmivora* e *P. theobromicola* (Pinho Ramos-Sobrinho e Marelli, 2021) possuem uma fase de desenvolvimento no solo e nas raízes das

plantas, tornando-se importante para o início da infecção nos frutos. A associação com as raízes do cacaueiro, sem provocar danos aparentemente visíveis às plantas, funciona como um início para as infecções dos frutos próximos ao solo (Luz & Mitchell 1994 a, b; Decloquement et al. 2021).

A podridão-parda é causada por um complexo de espécies de *Phytophthora* spp. (Luz et al., 2001). *Phytophthora* spp. pertence ao reino Straminipila, filo Oomycota, Classe Oomycetes, Ordem Peronosporales, Família Phytophthoraceae (Ho et al., 2018). São catalogadas hoje no mundo cerca de 313 espécies de *Phytophthora* spp., sendo que cerca de sete dessas espécies são causadoras da podridão-parda em cacaueiro (Ho, 2018; Bailey& Meinhardt, 2016). No Brasil, por muitos anos, essa doença foi atribuída apenas à *Phytophthora palmivora*, porém, posteriormente, outras espécies foram descobertas como causadoras da podridão, levando à ocorrência de severas epidemias (Silva Neto et al., 2001).

Diferentes espécies de *Phytophthora* spp. (*P. megakarya*, *P. palmivora*, *P. capsici* e *P. citrophthora*) estão associadas como as principais causadoras da doença podridão-parda em diferentes localidades do mundo. Quatro delas ganham destaque, pois foram relatadas no Brasil (End et al., 2014; Guest, 2007; Ali et al., 2016; Faleiro et al., 2004). *Phytophthora megakarya* (considerada a espécie com maior grau de agressividade) é restrita a países localizados no Oeste e África Central, enquanto *P. palmivora* tem um amplo espectro de ocorrência em todo o mundo (Ali et al., 2016; Bailey& Meinhardt, 2016). *Phytophthora citrophthora e P. capsici* também têm sido descritas como sendo de importância econômica para a cultura do cacau no Brasil (Lawrence et al., 1990; Bailey& Meinhardt, 2016). E atualmente, a *P. theobromicola* foi uma nova espécie relatada no Brasil, mas especificamente no Estado da Bahia, com alto grau de agressividade (Decloquement, 2021).

As espécies *Phytophthora* spp. são classificadas como oomicetos, apresentando características distintas, como parede celular composta por celulose e β-glucanas, em vez de quitina, o que as difere do reino Fungi (Alexopoulos et al., 1996; Dick, 2001). Outra característica importante que diferencia os oomicetos dos fungos é a fase vegetativa diploide; na meiose, eles produzem gametângios masculinos (anterídio) e femininos (oogônio) (Brasier, 1992; Luz & Matsuoka, 2001). Seu micélio é composto por células hialinas, ramificadas e não septadas. A propagação ocorre pela dispersão dos esporos, impulsionada pelo vento e pela água. Os esporângios são estruturas assexuadas

que se desenvolvem nas extremidades das hifas, podendo ser papilados, semipapilados ou não-papilados, caducos ou persistentes (Bush et al., 2006).

Os esporângios podem germinar diretamente por meio de tubos germinativos e hifas ou pela liberação de esporos assexuados móveis, chamados zoósporos (Perrine-Walker, 2020). Os zoósporos são hialinos, ovoides e biflagelados, liberados quando ocorre o ápice do esporângio. Essa estrutura, junto com os propágulos móveis, é a principal unidade para promover a infecção, dispersando-se pela água e encistando na superfície do hospedeiro; posteriormente, ocorre a germinação e a infecção (Luz et al., 2001; Ho, 2018).

O patógeno pode produzir estruturas de resistência; os clamidósporos também são considerados estruturas de sobrevivência, favorecendo seu tempo de inatividade quando não encontram fatores abióticos favoráveis para a infecção. Eles possuem coloração hialina, amarela/castanha, são esféricos, intracelulares ou terminais, com paredes finais delimitadas por um septo quando germinam, produzem o esporângio (Ho, 2018). *Phytophthora* spp. pode ser heterotálica ou homotálica. Durante o processo de reprodução sexual, ocorre o contato gametangial entre oogônio e anterídio, produzindo um oósporo que, inicialmente, é hialino e se torna amarelado a castanho com parede espessa (Luz et al., 2001).

2.3 Epidemiologia e controle

As diferentes espécies de *Phytophthora* spp. são encontradas atacando seus hospedeiros em diferentes fases. Elas são capazes de infectar todos os órgãos da planta, causando tombamentos, podridão das raízes e colo, podridão das flores e frutos, além da ‘’queima’’ e manchas nos órgãos aéreos (Erwin & Ribeiro, 1996; Ristaino& Johnston, 1999; Rizzo et al., 2002; Agrios, 2005; Dusntan et al., 2010; Saltos et al., 2022). As espécies causadoras da podridão parda possuem um ciclo de vida semelhante, dividido entre a fase assexuada e sexuada, sendo a fase assexuada a mais comumente encontrada na natureza (Reis et., al 2023)

A fase sexuada pode apresentar reprodução heterotálica ou homotálica. No segundo caso, é necessário o acasalamento entre dois isolados compatíveis, denominados mating-type (A1 e A2), para ocorrer a formação do oósporo (Erwin et al., 1983; Luz et al., 2001; Kudjordjie, 2015; Ho, 2018). Caso ocorra a reprodução sexuada, mesmo que remotamente, é possível uma quebra de resistência devido à alta variabilidade genética

(Kudjordjie, 2015). Para algumas espécies, como *P. citrophthora*, nunca foram identificados mating-types, sendo consideradas estéreis (Luz et al., 2001).

Na fase assexuada, *Phytophthora* spp. produz clamidósporos em condições favoráveis (umidade relativa acima de 80%, temperatura média entre 20 e 25 °C e água disponível), que germinam e dão origem ao esporângio (Akrofi et al., 2015; Luz et al., 2001; Kudjordjie, 2015; Ho, 2018). Os esporângios liberam zoósporos que podem percorrer longas distâncias com o auxílio da água, realizando o processo de infecção da planta. Outra forma de infecção ocorre através dos respingos d'água que tocam no solo e transportam as estruturas para a superfície dos frutos, que encistam e penetram no tecido da planta, causando uma infecção indireta (Oliveira et al., 2014; Kudjordjie, 2015; Ho, 2018).

2.4 Mapeamento de QTLs para Resistência do Cacaueiro e a construção de mapas genéticos por meio de marcadores SNP's

As doenças do cacaueiro ainda representam o principal obstáculo para o avanço econômico da cultura. Para estudar estratégias eficazes de combate aos patógenos, é essencial compreender a estrutura genética do cacaueiro. Isso permite inferir como ocorre a resistência genética e replicar esses mecanismos para o melhoramento genético da cultura. Nesse sentido, o estudo de QTLs tem sido empregado para compreender as bases genéticas relacionadas à resistência às doenças que afetam o cacaueiro (Lanaud et al., 2009).

Nos últimos anos, a pesquisa sobre QTLs tem se concentrado na identificação e gestão mais eficientes de locais que possam acumular fatores de resistência nas variedades trabalhadas. Além disso, os QTLs permitem a identificação de genes de resistência associados a características de defesa da planta. Para auxiliar esse processo, os QTLs são identificados por meio de seleção assistida via utilização de marcadores moleculares (Lanaud et al., 2009).

É possível empregar diversas técnicas de biologia molecular para identificar a variabilidade genética na sequência de DNA. Dentre essas, destacam-se os microssatélites (*SimpleSequenceRepeats* - SSR), que consistem em pequenos fragmentos de DNA formados por sequências curtas de dois a cinco nucleotídeos repetidos em tandem, flanqueados por uma sequência única não repetida (Hancock, 2000). Nas plantas, é comum identificar diversos microssatélites distribuídos ao longo do genoma. Atualmente,

vários loci de microssatélites estão mapeados e distribuídos pelos dez cromossomos do *Theobroma cacao* (Lanaud et al., 1995; Pugh et al., 2004; Brown et al., 2005; Schnell et al., 2007; Faleiro et al., 2006; Allegre et al., 2011)."

A construção de um mapa genético disponibiliza uma quantidade expressiva de informações cruciais para o melhoramento genético de uma determinada espécie. Essas informações abrangem desde a associação de marcadores com caracteres qualitativos até a localização desses marcadores nos grupos de ligação, além da identificação de regiões genômicas associadas a caracteres quantitativos (QTL) (Ferreira &Grattapaglia, 1995). A elaboração de um mapa requer condições básicas, incluindo a identificação de marcadores genéticos, a seleção de uma população segregante, o estabelecimento da ordem dos marcadores genéticos e a determinação das distâncias entre eles (Vieira et al., 2006).

O mapeamento de QTL torna-se possível graças à associação entre dados fenotípicos e marcadores moleculares. Ele permite a mensuração do número de loci quantitativos envolvidos em uma herança complexa, além de determinar sua localização no cromossomo e modo de ação gênica. Além disso, possibilita a decomposição da interação genótipo-ambiente no nível de cada QTL (Carneiro; Vieira, 2002).

Em *Theobroma cacao L.*, diversos QTLs associados à resistência a doenças foram identificados em diferentes estudos e utilizados em uma abordagem de meta-análise que resultou em um mapa mais detalhado das regiões genômicas, confirmando a existência de diferentes fontes de resistência para as doenças do cacaueiro (Lanaud et al., 2009).

2.5 Caracterização proteômica e a interação planta-patógeno

As proteínas desempenham um papel fundamental no funcionamento celular, e o estudo dessas moléculas fornece informações essenciais para compreender os processos celulares, sendo denominado proteômica (Görg et al., 2000). O termo "proteoma" refere-se ao conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um organismo em um determinado momento ou condição (Alexandra et al., 2013). A proteômica é um conjunto de ferramentas bioquímicas usadas para descrever a expressão e a função reguladora de todas as proteínas codificadas por um organismo (Noah et al., 2013), possibilitando avaliações quantitativas e qualitativas sobre as proteínas que participam no metabolismo celular.

A proteômica tem sido integrada às pesquisas genômicas na era pós-genômica, graças aos avanços proporcionados pelo sequenciamento em larga escala do DNA (Mann

et al., 2001). Essa abordagem fornece informações cruciais para o estudo das propriedades das proteínas, incluindo níveis de expressão, modificações pós-traducionais e interações planta-patógeno (Balbuena et al., 2011). Além disso, a proteômica contribui para o entendimento das vias de sinalização celular e do conjunto de proteínas reguladoras, sendo aplicável para obter informações complementares sobre os estados fisiológicos e fisiopatológicos de células e organismos (Mann e Jensen, 2003; Newton et al., 2004).

A caracterização proteômica é essencial para auxiliar os estudos genômicos, uma vez que a dinâmica das proteínas em um sistema vivo é influenciada por fatores internos e externos que determinam alterações estruturais e conformacionais. O estudo da proteômica permite examinar simultaneamente mudanças e classificar padrões temporais de acúmulo de proteínas em diferentes estágios de desenvolvimento (Balbuena et al., 2011).

Estudos de proteômica vegetal têm sido conduzidos para avaliar as proteínas expressas em tecidos e órgãos vegetais, monitorando alterações e avaliando a influência de estímulos ambientais nos padrões de expressão proteica (Agrawal et al., 2005). Esses estudos abrangem variações em respostas fisiológicas (Gallardo et al., 2001) e nas interações hospedeiro-patógeno, contribuindo para pesquisas que possam auxiliar no melhoramento genético de plantas, incluindo o estudo de proteínas de defesa (Elvira et al., 2008).

2.6 Indução de proteínas de defesa em plantas

O estudo de defesa em organismos vegetais é uma prática realizada há quase quatro décadas, e ainda hoje existem pontos não esclarecidos a respeito desse processo. O ácido jasmônico (AJ), por exemplo, inicialmente aceito desempenhando um papel secundário quando relacionado ao processo de sinalização e defesa vegetal, passou a ser considerado protagonista na indução local e sistêmica de genes de defesa da planta (Stratmann, 2003). Pois é sabido que diversas vias de sinalização estão interligadas e interagem com a formação do ácido jasmônico.

O processo de resistência de algumas plantas a patógenos específicos envolve uma complexa rede de sinais, cujos componentes ainda requerem estudos mais detalhados. Entre os mecanismos de defesa da planta contra a ação do patógeno, os mediados pelos genes R são os mais bem caracterizados (Elvira et al., 2008). Os genes R são altamente polimórficos e possuem uma alta especificidade de reconhecimento, podendo ocorrer

como parte de uma família de genes em 'clusters' que evoluíram por duplicação e recombinação (Bioci et al., 2011). A expressão da resistência é governada pelos genes R no hospedeiro e pelos genes de avirulência (Avr) no patógeno, sendo iniciada quando ocorre a interação entre esses genes incompatíveis. O desencadeamento das vias de defesa pelos genes R gera um fluxo massivo de íons celulares, levando ao acúmulo de superóxidos e peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e resposta de hipersensibilidade (Bioci et al., 2011).

Além disso, plantas acometidas por estresses abióticos e bióticos sofrem alterações em seu padrão de proteínas, podendo ocorrer tanto a inibição quanto a indução da síntese de determinados constituintes proteicos (Ryan, 2000). Entre as principais proteínas de defesa presentes nas plantas destacam-se lectinas, inibidores de proteases, serinas e cisteínas (Pernas et al., 2000; Siqueira-Júnior et al., 2002), polifenoloxidases (PFO) (Constabel & Ryan, 1998), peroxidases (POX), fenilalanina-amônia-liase (FAL) e as proteínas relacionadas à patogênese (RP) (Linhorst, 1991; De Wit et al., 2007), sendo estas as mais bem descritas quanto às suas propriedades de defesa vegetal (Chen, 2008).

3. CAPÍTULO 1

Mapeamento genético para resistência à *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora theobromicola* e identificação de genes associadas à resistência do cacaueiro

4. INTRODUÇÃO

O cacaueiro (*Theobroma cacao L.*) é uma cultura importante mundialmente, devido a suas amêndoas serem utilizadas como matéria-prima para a produção de chocolate. No entanto, a produção de cacau tem sido impactada por pragas e doenças em todo o mundo, entre elas a podridão-parda causada por *Phytophthora* spp. Assim, para identificar loci de características quantitativas (QTL) associados à resistência à doença da podridão-parda, utilizou um mapeamento de QTL em uma população segregante compreendendo 459 árvores.

Além disso, foi utilizado um chip com 3.500 marcadores SNP e dez anos de dados de campo. Os picos de QTL (limiar de LOD de 3,1) foram mapeados de 3,13 a 3,28 Mb no cromossomo IV e V, compreendendo uma região genômica de 0,15 Mb. Com base no genoma do cacau Matina 1-6, 292 sequências transcritas de genes foram relatadas nesta região genômica. Para identificar genes candidatos à resistência contra a doença da podridão-parda, examinamos árvores exibindo eventos de recombinação para ambos os haplótipos parentais dentro da região QTL e entre marcadores SNP flanqueadores.

A análise dos haplótipos parentais revelou que a resistência à doença da podridão-parda é herdada do haplótipo materno ('TSH 1188'). Descobrimos eventos de recombinação para pelo menos os haplótipos parentais ocorrendo em cinco locais genômicos distintos, mas alguns eventos de recombinação ocorreram nos mesmos locais. Perto desses eventos recombinantes, encontramos genes importantes relacionados a processos de defesa bem conhecidos durante interações planta-patógeno.

O reconhecimento de efetores de patógenos, resposta de hipersensibilidade, morte celular programada, resposta de resistência sistêmica e respostas de defesa dependentes de fito-hormônios a infecções por patógenos foram respostas identificadas durante o mapeamento. Dessa forma, permite-se inferir que esses genes desempenham um papel na resistência dos cacaueiros à doença da podridão-parda, e esse conhecimento pode ser usado por programas de melhoramento em todo o mundo para facilitar a seleção assistida por marcadores.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material vegetal e condições de cultivo

O experimento foi conduzido no laboratório de biologia molecular, no MCCS (Mars Centro de Ciência do Cacau), localizado no município de Barro Preto–BA, Brasil. Genótipos de cacau que apresentavam diferentes características de resistência baseadas em literatura e observações de campo ao ataque de *P. palmivora* e *P. theobromicola*, para realização do experimento. Selecionaram-se os clones FB 206 (suscetivel), TSH 1188 (mediamente resistente), CCN 51 (resistente). O trabalho realizado de mapeamento genético utilizou a população MP01, formada pelo cruzamento de duas variedades (''CCN 51'' e ''TSH 1188'') de cacau com características agronômicas contrastantes. Foram utilizados 459 genótipos da MP01 para identificar novas fontes de resistência, bem como encontrar regiões genômicas relacionadas com a resistência à podridão-parda.

5.2 Preparo do inóculo: *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora theobromicola* (Santos e Luz, 2011)

Preparo dos meios de cultura: os meios utilizados foram à base de cenoura para *P. palmivora* e meio à base de tomate para *P. theobromicola* (Figura 1). Os meios foram preparados e autoclavados conforme as recomendações, e em seguida são colocados para desenvolver seu crescimento por meio de plugs de micélio. Esse processo foi realizado em uma capela de fluxo laminar para garantir a assepsia. Após a inoculação do plug de micélio nos meios, as placas foram incubadas em B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio) por 4 dias a uma temperatura de 25 °C, em condições de escuro total. Após o crescimento dos micélios nas placas, estes são cortados em retângulos de 1 cm de largura e 1 cm de comprimento. Doze retângulos são transferidos para placas de Petri de vidro e adicionados aos meios de cultura líquidos correspondentes a cada patógeno. As placas são incubadas em B.O.D por 6 a 9 dias com luz *fulltime*. (Figura 2). No dia seguinte é realizado o estresse e a liberação dos zoósporos (Figura 3), as placas são selecionadas, é aplicado o primeiro estresse, que consiste em retirar o meio líquido das placas e retorná-las ao B.O.D. No dia seguinte, é aplicado o segundo estresse, que consiste em aplicar água gelada para a liberação dos zoósporos. As placas são mantidas sobre a bancada por 40 minutos a 1 hora, e em seguida a água é retirada e armazenada em tubos Falcon de 50 ml. Para a contagem dos zoósporos: uma alíquota de 20 microlitros da suspensão de zoósporos é retirada e vortexada para homogeneização e inativação do zoósporo. A

alíquota é então aplicada em câmara de Neubauer por capilaridade para contagem dos zoósporos, e o inóculo é preparado ajustado a uma concentração de 7,5x10^5 µL. (Figura 2).

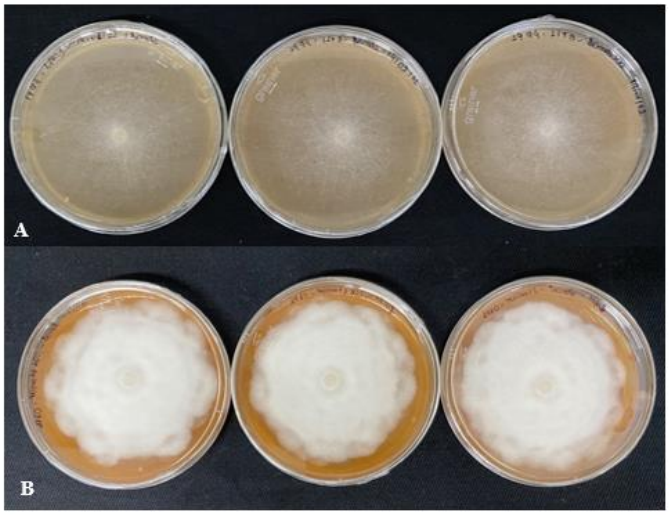

Figura 1: A: Micélio de *P. palmivora* em meio de cultura de cenoura; **B**: Micélio de *P. theobromicola* em meio de cultura de tomate 5%.

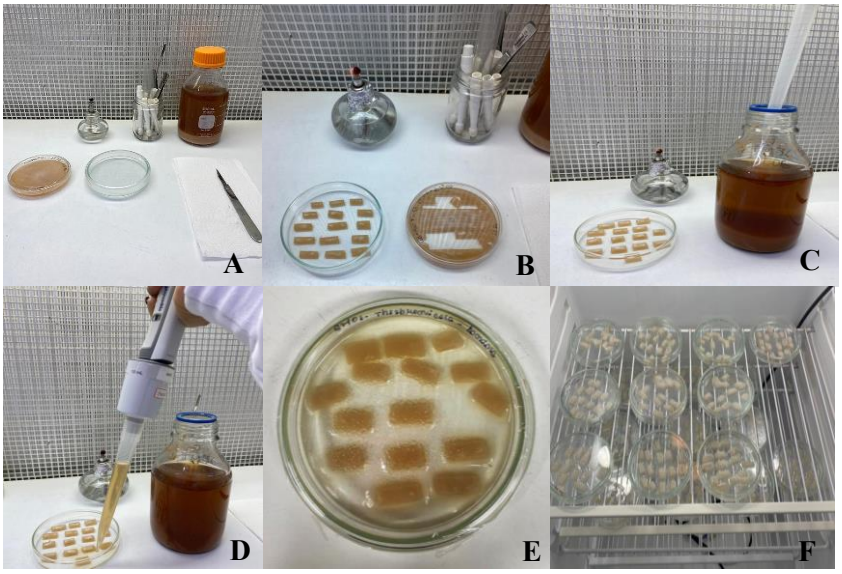

Figura 2: A: Matérias para inoculação em capela de fluxo laminar; **B:** Corte do micélio em tiras; **C:** Preparo de placa com pedaços da cultura de oomiceto em fluxo laminar; **D:** Adição de meio líquido; **E:** Pedaços da cultura do oomiceto em placa de Petri; **F:** Incubação do micélio em tiras na B.O.D, sob luz constante.

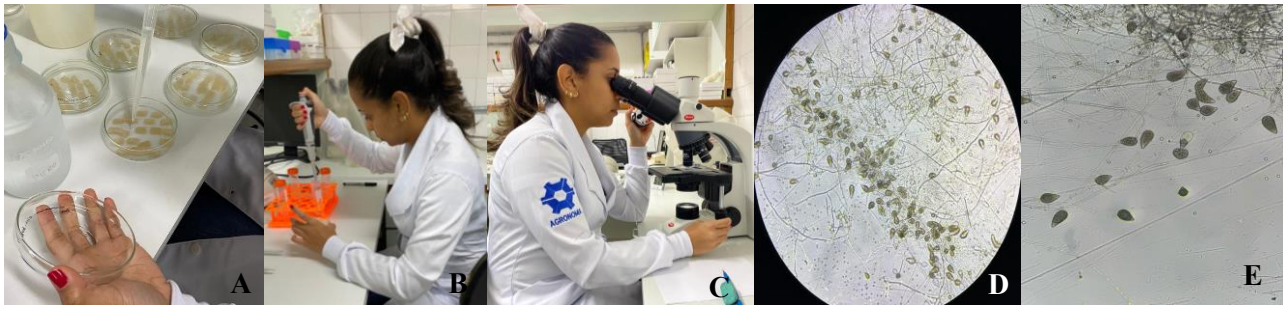

Figura 3: A: Aplicação da água gelada nas placas selecionadas; **B:** Coleta de 20 µl alíquota; **C:** Contagem dos zoósporos em câmara de Neubauer; **D/E:** zoósporos observados em placa de Petri, com o auxílio de microscópio utilizando a objetiva de 40x.

5.3 Inoculação realizada em campo e laboratório

As inoculações realizadas em campo e laboratório utilizaram como base para o experimento, frutos de cacau com diferentes estágios de maturação. Diante, disso selecionou-se seis diferentes estágios de maturação (60, 75, 90, 105, 120 e 130 dias) para realizar as inoculações em campo e laboratório nos genótipos, FB 206 (susceptível) TSH 1188 (mediamente resistente) e CCN 51 (resistente) a fim de verificar a presença ou ausência da lesão nos estágios de maturação inicial, intermediário e final durante cinco dias após a inoculação.

Para realizar o processo de infecção em campo e laborátorio, utilizou-se um lenço de papel marca (Kimwipes -Kimtech HOEA1430 O-Tech) utilizado como auxílio para fixação do inóculo sobre o fruto. Com um auxílio de uma pinça de relógio, o lenço de papel recortado com 1 cm de largura e 1 cm de comprimento é colocado sobre o fruto e posteriormente aplicado sobre o papel 25 microlitros do inóculo. Os frutos são apoiados em suportes dentro de caixas plásticas forradas com papel toalha e umedecidas com água destilada estéril, onde é criada uma câmara úmida. A temperatura e umidade são controladas para favorecer o desenvolvimento dos patógenos (Figura 4). O experimento foi conduzido utilizando um total de 180 frutos de cacau em campo e 180 frutos de cacau em laboratório, todos com 120 dias de maturação. Estes frutos foram divididos em blocos, com 90 frutos inoculados com *Phytophthora palmivora* e 90 frutos inoculados com *Phytophthora theobromicola*. O delineamento experimental adotado foi o Delineamento em Blocos Casualizados (DBC), onde cada bloco corresponde a um grupo de frutos

inoculados com um dos patógenos. A aleatorização foi empregada dentro de cada bloco para garantir que cada fruto tivesse uma chance igual de ser inoculado com qualquer um dos patógenos, minimizando variações e garantindo a representatividade dos resultados.

Para a coleta de dados foram medidas a altura e a largura da lesão durante cinco dias, para coleta dessas informações utilizou-se um paquímetro (unidade de medida: milímetros) e em seguida adicionadas a uma tabela de Excel e com auxílio de uma fórmula: =PI () *((K1062/2) *(L1062/2)), por exemplo, foi calculada a área da lesão, dados que posteriormente serão utilizados para construção do mapeamento genético.

Essa fórmula está calculando a área do círculo (cm²):

- PI () retorna o valor de π (aproximadamente 3,14159).
- K1062/2 é o raio do círculo, supondo que o valor em K1062 seja o diâmetro do círculo.
- L1062/2 também está tratando um valor como raio (se L1062 também for um diâmetro)

Figura 4: A: Aplicação de 25 µl do inóculo sobre a casca do fruto; **B:** Frutos organizados sobre o suporte; **C:** Caixas plásticas contendo os frutos, criando uma câmara úmida; **D:** Inoculação em campo.

5.4 Mapa de ligação e mapeamento QTL

Para realizar o mapeamento de QTL, utilizamos um mapa de ligação de cacau contendo 3500 SNPs e baseado em 459 árvores da população MP01 (Royaert et al., 2016). Para a detecção inicial de QTL com efeitos principais, a primeira rodada de mapeamento de intervalo (IM) foi realizada para selecionar marcadores SNP que segregam significativamente para os traços de resistência ao ataque de *P. palmivora* e *P. theobromicola* avaliados na MP01. Utilizamos uma aproximação de regressão para o intervalo de máxima verossimilhança para estimar os efeitos do QTL. O valor

significativo do logaritmo das chances (LOD) foi determinado analisando 10.000 permutações com valores de $p \leq 0,05$. Em seguida, os marcadores SNP que mostraram os maiores valores de LOD foram selecionados como cofatores para o mapeamento de intervalo múltiplo (MQM) com o software MapQTL (versão 6; Kyazma BV, Wageningen, Holanda). Representações gráficas dos cromossomos contendo QTLs com efeitos significativos e picos de escores LOD foram desenhadas usando o software MapChart, versão 2.3.

5.5 Genes candidatos dentro das regiões QTL

Para identificar potenciais genes candidatos que estão associados com os efeitos dos QTL e as variações fenotípicas, foi utilizada como base a região genômica os QTLs mapeados no modelo genético Matina 1–6 v1.1 5 e genoma Criollo v2.0 4. Exploramos as anotações de modelos genéticos disponíveis em conjunto com as famílias, domínios e locais funcionais de proteínas (INTERPRO) e outras ferramentas de enriquecimento, como mapas de vias biológicas (KEGG) e reações enzimáticas (EC). Procuramos os genes relacionados com a resistência ao ataque de *Phytophthora*, classificados como envolvidos com a resposta de defesa das plantas e com a sinalização de vias metabólicas que estejam associadas à imunidade vegetal. Além disso, procuramos genes que possam estar atuando de forma indireta e que ainda o seu processo de envolvimento com a resposta imune da planta ainda não seja bem conhecido.

5.6 Análise de dados

Os dados foram obtidos calculando a área da lesão, determinada a partir das medidas de altura e largura da lesão durante cinco dias de avaliação. Em seguida, calculamos as melhores previsões lineares não viesadas (BLUP) utilizando um modelo linear misto ajustado pela máxima verossimilhança (Bates et al., 2015). A equação do modelo linear misto geral ajustado para cada variável foi:

$$y = \mu + X_{\mathrm{b}} + Z_{\mathrm{a}} + e$$

Onde y é o vetor da variável resposta, μ é a média da variável, a é o vetor de efeito aleatório para indivíduos, b é o parâmetro de efeito fixo para anos e e é o erro. X e Z são valores da matriz de incidência. Estimativas de componentes de variância foram utilizadas para calcular a herdabilidade de sentido amplo (H^2). Além disso, utilizamos

valores BLUP para realizar a análise dos componentes associados à resistência a patógenos.

5.7 Associações haplótipo-fenótipo

Usamos dados de haplótipos SNP em fases (Livingstone et al., 2015) para identificar as associações haplótipo-fenótipo favoráveis à resistência e possíveis variáveis relacionadas. Primeiro, calculamos os dados médios para cada variável e, em seguida, definimos as faixas fenotípicas usando a função de distribuição de frequência disponível no pacote R 'fdth' (Faria, 2018) com o número de intervalos de classe (k) definido como quatro. A análise aplicou o teste qui-quadrado de Pearson para contar cada combinação de alelos dentro das classes fenotípicas para cada variável avaliada, para testar as associações haplótipo-fenótipo significativas para cada marcador SNP com o maior escore LOD. As combinações parentais de haplótipo/alelo foram designadas como T1 e T2 para 'TSH 1188' e C1 e C2 para 'CCN 51'. Registramos a frequência de cada haplótipo parental e suas combinações (T1C1, T1C2, T2C1 e T2C2) apresentadas em cada progênie de MP01.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Seleção do estágio de maturação dos frutos para inoculação com *P. palmivora* e *P. theobromicola*

A podridão-parda acomete os frutos de cacau em diversos estágios de maturação, contudo, não é observada em campo com frequência a infecção em frutos com estágio de maturação inicial (60 dias). Contudo, foi observado que durante os primeiros dias de inoculação as lesões não avançaram tão rapidamente, isso pode estar associado aos fatores abióticos, como a umidade e a temperatura, que não apresentou variações significativas em campo nos três primeiros dias de avaliação. Ao final da avaliação (5º dia após a inoculação), ocorreram mudanças climáticas que alteraram as condições de umidade e temperatura e podem ter sido um fator que favoreceu o aparecimento da infecção, uma vez que os propágulos de *Phytophthora* spp. necessitam de umidade e temperatura para germinarem e infectarem plantas hospedeiras (Reis, 2023).

Para os resultados em laboratório, foi possível avaliar incidência da doença em todos os estágios de maturação avaliados (60, 75, 90, 105, 120, 135 dias), o genótipo TSH 1188 quando infectado para *p. theobromicola* apresentou uma porcentagem média de frutos infectados ligeiramente maior, com 40%, em comparação com o genótipo CCN 51, que teve 38,33% de frutos infectados e para o patógeno *p. palmivora* O genótipo TSH 1188 apresentou uma porcentagem média de frutos infectados maior, com 40%, em comparação com o genótipo CCN 51, que teve 35%. A presença da doença após 3 dias de inoculação é justificada pelas condições favoráveis e monitoradas de laboratório que permite que a infecção ocorra sem maiores empecilhos. Dessa forma, foi possível inferir que em condições climáticas favoráveis ao patógeno causa infecção em todos os estágios de maturação. Contudo, a maior presença de lesão se encontra no estágio de 120 dias, sendo esse selecionado para o seguimento do experimento e posteriores avaliações, uma vez que os frutos com estágio de maturação de 120 dias apresentam características importantes para o trabalho, como: tamanho do fruto, reservas metabólicas bem formadas e a identificação fenotípica da lesão (Figura 5 e 6) (Gráfico 1 e 2).

Figura 5: A: Painel de lesão CCN 51 (resistente) em laboratório para os estágios de maturação avaliados (60,75,90, 105,120,135 dias) para o patógeno *P. palmivora.* **B:** Painel de lesão TSH 1188 (mediamente resistênte) em laboratório para os estágios de maturação avaliados (60,75,90, 105,120,130 dias) em para o patógeno *P. palmivora.*

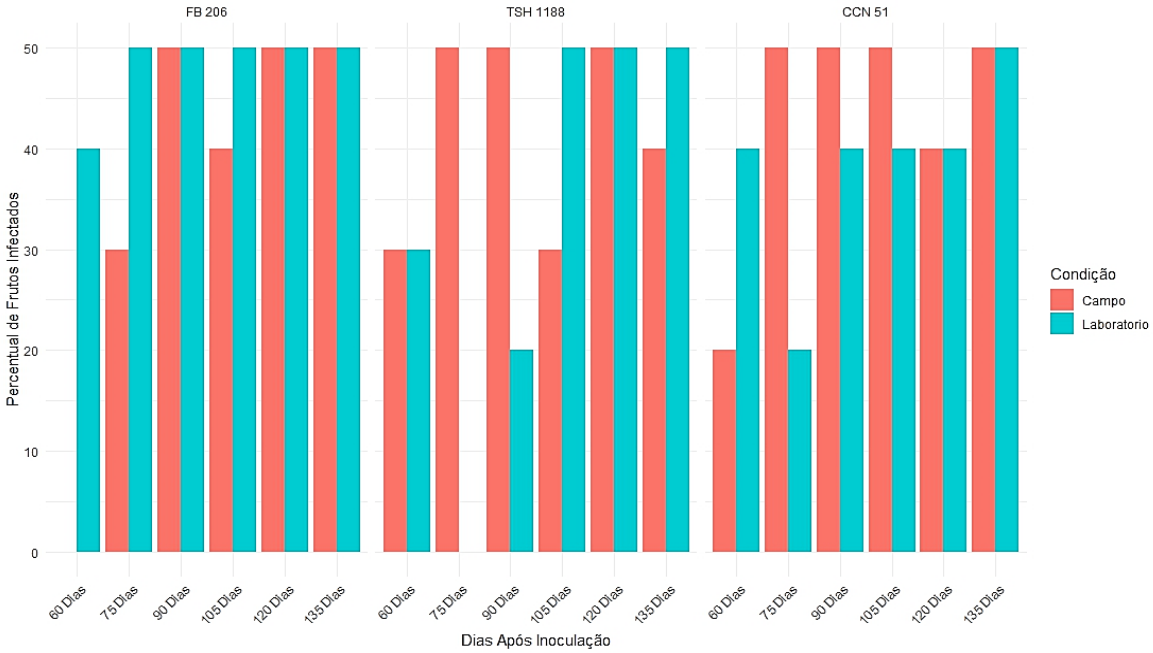

Gráfico 1: Comparação das lesões para os estágios de maturação avaliados (60,75,90, 105,120,135 dias) em campo e laboratório para o patogéno *P. palmivora.* Genótipos: FB206 (sucetivel), TSH1188 (mediamente resistente), CCN51 (resistente),

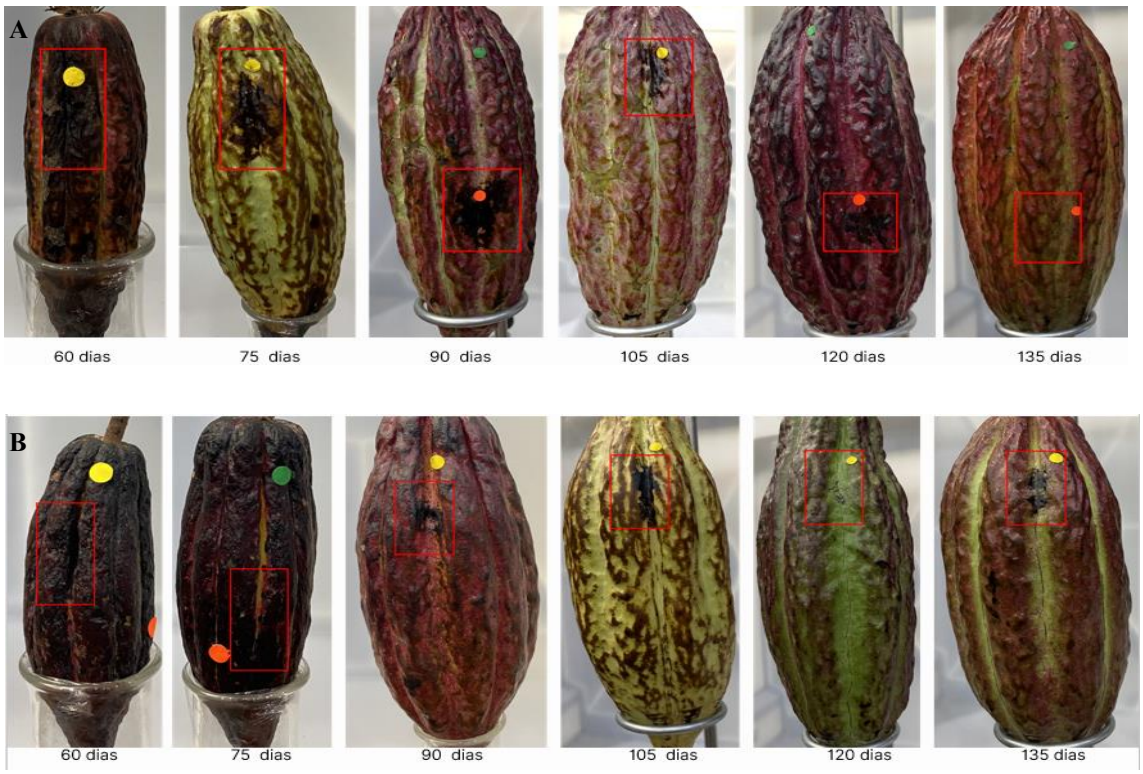

Figura 6: A: Painel de lesão CCN51 (resistente) em laboratório para os estágios de maturação avaliados (60,75,90, 105,120,135 dias) em campo e laboratório para o patógeno *P. theobromicola.* **B:** Painel de lesão TSH1188 em laboratório para os estágios de maturação avaliados (60,75,90, 105,120,130 dias) em campo e laboratório para o patágeno *P. theobromicola.*

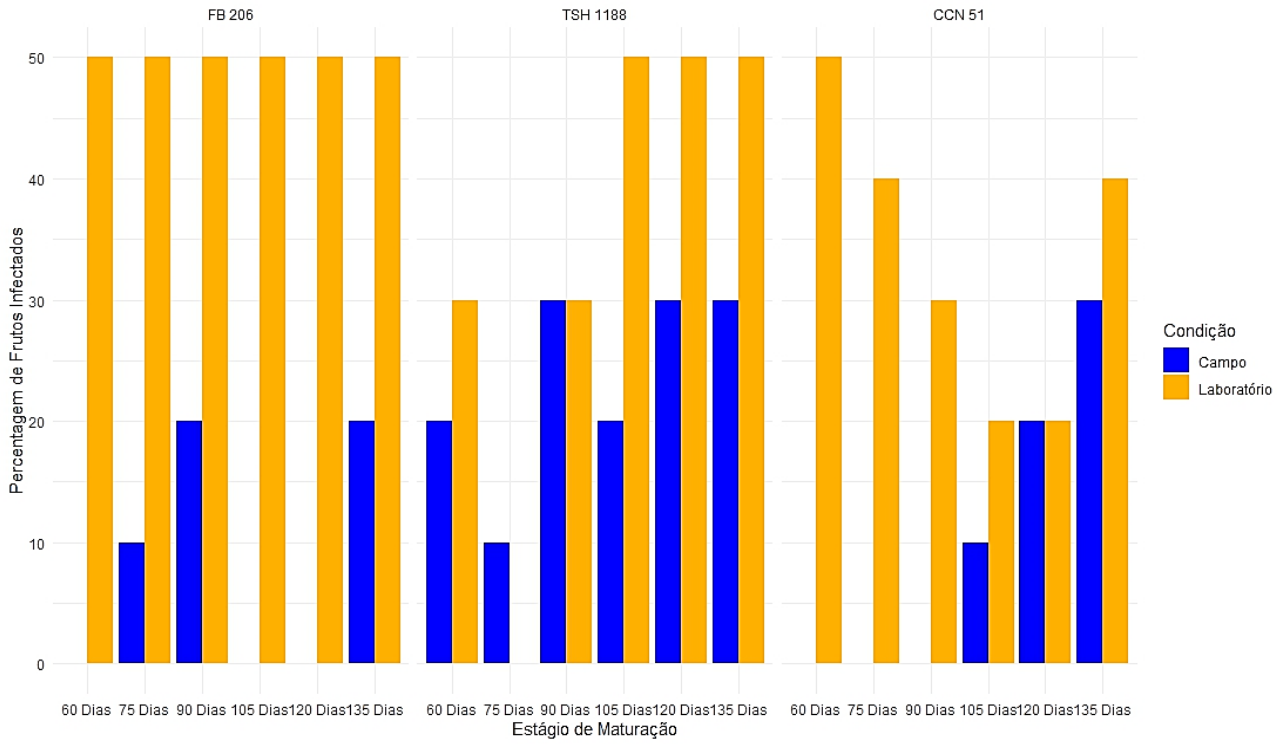

Grafico 2: Comparação das lesões para os estágios de maturação avaliados (60,75,90, 105,120,135 dias) em campo e laboratório para o patógeno *P. theobromicola.* Genótipos: FB206 (sucetivel), TSH1188 (mediamente resistente), CCN51 (resistente).

Figura 7: A: Painel de lesão CCN51 (resistente) em campo para os estágios de maturação avaliados (60,75,90, 105,120,135 dias para o patógeno *P. palmivora e P. theobromicola* **B:** Painel de lesão TSH1188 em campo para os estágios de maturação avaliados (60,75,90, 105,120,130 dias) em campo para o patogéno *P. palmivora e P. theobromicola.*

6.2 Variação fenotípica

Após a inoculação com os isolados MCCS-MB-01994 (*P. palmivora*) e MCCS-MB-1960 (*P. theobromicola*), foi observado o tamanho da lesão (como citado na metodologia) ao longo de 7 dias após a inoculação (DAI) para FB 206 – referência de susceptibilidade – e 308 genótipos da MP01, sendo 145 genótipos inoculados para *P. palmivora* e 201 para *P. theobromicola*.

As lesões foram medidas após dois dias de inoculação sendo possível observas lesões pequenas que evoluíram rapidamente até o 5º dia após a inoculação. As lesões observadas para os genótipos que segregam com as características do genitor paterno (CCN 51) forma menor para ambos os patógenos avaliados quando comparados ao TSH 1188

A população MP01 é composta por 459 genótipos, porém durante o trabalho realizado no mestrado foi possível avalias apenas 342 genótipos para a infecção *por P. palmivora* e *P. theobromicola*. O parental CCN 51 forma o grupo dos mais resistentes com 200 genótipos inoculados com *P. theobromicola* e 142 genótipos inoculados com *P. palmivora*, dos quais 197 (98,5%) genótipos em pelo menos uma das repetições

apresentaram incidência para a doença para *P. theobromicola* e 114 (80,28%) dos genótipos inoculados em pelo menos uma das repetições apresentaram incidência para a doença para *P. palmivora* respectivamente. Contudo é necessário, salientar que o trabalho foi realizado em quintuplicata, e houveram repetições que apresentaram lesão nos mesmos genótipos avaliados. Esse resultado, mostra como a agressividade do isolado 1960 (*P. theobromicola*) é maior quando comparado a isolado 1994 (*P. palmivora).* (Figura 8).

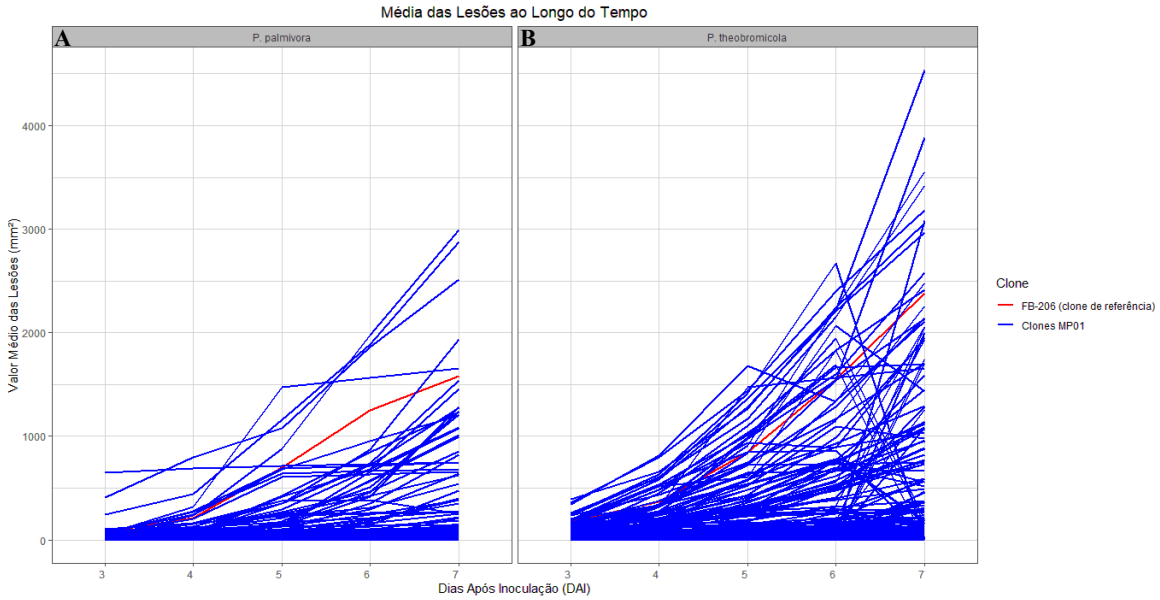

Figura 8: A: FB 206 (clone de referência): Representado pela linha vermelha. Este clone é usado como referência de resistência para comparar o desenvolvimento de lesões ao longo dos dias após a inoculação (DAI). **B: Clones MP01**: Representados pelas linhas azuis. Esses clones são testados para comparação com o clone de referência FB 206 em relação ao desenvolvimento de lesões ao longo do tempo. A densidade das linhas azuis reflete a variação entre os clones.

6.3 Principais haplótipos que estão associados a resistência genética e seleção de genes candidatos

Nossa análise mostrou que os haplótipos maternos tiveram o efeito mais significativo na variação fenotípica das características avaliadas (Royaert et al., 2016) (Fernandes et al 2018). Esses resultados foram parecidos com os catalogados pelo Mars Centro de Ciência do Cacau (MCCS), conferindo uma adição maior para os trabalhos realizados. Até o momento, na população MP01, os alelos maternos foram avaliados como os que mais afetam as características economicamente importantes, como resistência a doenças. Os alelos do "TSH 1188" são os que controlam as regiões do QTL com maiores escores de LOD (3,42), como o encontrado no cromossomo IV para ambos os patógenos. Somente para os marcadores SNP Tcm004s32249836, Tcm004s32267049

e Tcm004s32285527 tiveram um efeito significativo no controle da variação fenotípica para resistência a doenças. Estes resultados indicaram que possivelmente ocorre uma alta influência materna na herança de características complexas na população MP01.

Dado que encontramos um QTL explicando uma grande porcentagem da variação fenotípica para resistência a doença, podemos usar a região do cromossomo IV combinada com efeitos de haplótipos nas outras regiões do QTL, para selecionar variedades de cacau que apresentem maior resistência para a podridão-parda. Um efeito claro dos haplótipos maternos foi observado para os marcadores na região do cromossomo IV.

6.4 Análise de QTL e Identificação de genes candidatos

Os intervalos QTL flanqueados por marcadores SNP com escores LOD superiores a 3,1 foram considerados significativos. Utilizou-se o mapa de ligação genética da população MP01 (TSH 1188 × CCN 51). Encontramos marcadores moleculares associados com a resistência a *P. palmivora* e *P. theobromicola* nos cromossomos IV e V. Desses QTLs, destacamos regiões no cromossomo V que foi flanqueada por marcadores SNP significativos; eles são Tcm005s05496889, Tcm005s05497820, Tcm005s06133186, Tcm005s06133186, Tcm005s08884917, Tcm005s08903287, Tcm005s036154150. Dessa forma, as regiões de QTL analisadas mostram possíveis genes candidatos que codificam para respostas conhecidas no sistema de defesa da planta. Diante disso alguns genes foram selecionados pois estão expressando proteínas de defesa que estão associadas ao sistema de resposta da planta aos patógenos.

Os genes Thecc.05G282000 e Thecc.05G281700 codificam para as proteínas *Pathogenesis-related protein* PR2 e *Pathogenesis-related protein* PR-4B, respectivamente são proteínas pertencente as famílias das PRs, que são induzidas em plantas em resposta ao ataque de patógenos, além de estar relacionadas a estresses abióticos. A PR-2 representa um grupo de β-1,3-glucanases cujo papel na resistência a doenças está relacionado à sua atividade de glucanase. Essa proteína pode atuar prejudicando diretamente o crescimento de um fungo hidrolisando β-1,3/1,6-glucanos dentro das paredes celulares do fungo ou liberando pequenos fragmentos de glucano das paredes celulares do patógeno, que podem ser reconhecidas também pelas plantas e dessa forma, induzir mais respostas de defesa nas plantas, (Britto et al., 2013).

Pathogenesis-related protein PR-4B exibem a função de catalisar e hidrolisar a quitina, um homopolímero linear de β-1,4 resíduos de N -acetilglucosamina ligados. Como é sabido que as quitinases inibe o crescimento de diversos fungos e se acumulam ao redor de hifas nas plantas, foi proposto que a quitinase desepanham um papel fundamental no processo de defesa das plantas. Entre essas famílias de quitinases PR, a família PR4, compreende quitinases do tipo classe I e II. (Agrawal et al., 2003).

As proteínas PR-4 estão descritas em diversos estudos que mostram o envolvimento dessa família nas respostas de defesa das plantas que são reguladas por moléculas sinalizadoras como ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA), jasmonato (JA) e etileno (ET). No arroz, milho e trigo, a expressão do gene PR-4 foi induzida nas primeiras horas (até 96 h) após o contato com o fungo patogênico e/ou os elicitores fúngicos (por exemplo, moniliformina).

Além disso, são conhecidas pela sua função de degradação da ribonuclease, ou seja, elas podem degradar o RNA do patógeno invasor, e também estão associadas como os mecanismos de ativação da morte celular infectadas, contribuindo de forma significativa no processo de defesa vegetal. No genoma do cacau, TcPR-4b quando avaliada para a infecção de *M. perniciosa* mostrou presente em a uma pequena família multigênica organizada principalmente no cromossomo 5. A atividade antifúngica do TcPR-4b está diretamente relacionada à função da RNase. No cacau, as atividades da nuclease TcPR-4b podem estar relacionadas ao estabelecimento e manutenção da resistência, e ao mecanismo PCD, em genótipos de cacau resistentes e suscetíveis, respectivamente (Pereira Menezes et al., 2014).

O gene Thecc.05G284800 codifica para a porteina *Calmodulin-like 11* é uma pequena proteína ácida composta por quatros *EF-hands* descrito como um dos sensores de ativação do Ca2+ mais bem caracterizado (Kim et al., 2009). Além dela, as suas homologas também desempenham um papel importante no processo de transdução de sinais em plantas, incluindo a resposta a patógenos. Elas são conhecidas por se ligar ao cálcio e regular as atividades de várias proteínas-alvo incluindo as proteínas que estão envolvidas no processo de imunidade da planta em resposta a infecção por patógenos.

Um dos primeiros eventos de sinalização observados após o reconhecimento da infecção são fluxos de íons através da membrana plasmática, sendo um desses influxos o Ca2+ no citosol. Estudos revelam que a ação dos canais e bombas que governam o fluxo

de Ca 2 + através da membrana plasmática e do tonoplasto contribui para a geração de sinais citosólicos de Ca 2 + provocados por patógenos e PAMPs, e que a interrupção da homeostase do Ca 2 + afeta a capacidade das plantas para montar respostas de defesa apropriadas e eficientes contra patógenos (Cheval et al., 2013). Dessa forma, a calmodulina aparece como um ator central no controle dos sistemas de transporte de Ca2+.

É sabido que no genoma das plantas geralmente contem genes *CaM* (*Calmodulin-like 11*)que codificam diversas isoformas, conhecidas como proteínas semelhantes a *CaM* (*CMLs*) (Cheval et al., 2013). A exemplo, três isoformas diferentes de *CaM* e *50 CMLs* são previstas no genoma de *Arabidopsis* (MccorMack; Braam, 2003). Essas informações corroboram como fontes evidentes do envolvimento das isoformas de *CaM* e *CMLs* em diversos processos relacionados a imunidade das plantas

Os genes Thecc.05G085700, Thecc.05G265200, Thecc.05G265400 e Thecc.05G308400 codificam para a proteína *GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein*, essas proteínas estão envolvidas em diversos processos biológicos, incluído metabolismo de líquidos e resposta a estresses bióticos e abióticos. Na biologia vegetal, as proteínas *GDSL-like Lipase/Acylhydrolase* têm sido associadas a várias funções, incluindo a resposta a patógenos.

As famílias GDSL esterase e lipase desempenham papéis importantes no estresse abiótico, na defesa de patógenos, no desenvolvimento de sementes e no metabolismo lipídico (Tan et al. 2014). A presença da camada de florescimento no sorgo está associada à resistência ao inseto verde (Weibel e Starks 1986) e ao patógeno fúngico, E. turcicum (Jenks et al. 1994), ferrugem da bainha (Kasuga et al. 2001). Estas proteínas têm sido implicadas na degradação de lipídios de membrana de patógenos, desencadeando uma resposta de defesa nas plantas. Além disso, algumas proteínas desta família também têm sido associadas à síntese de cutina, uma camada lipídica que protege a superfície das folhas contra patógenos e estresses ambientais.

O gene Thecc.05G091200 que codifica a *Rho GTPase* proteínas ativadoras da PAK-*box/P21-Rho-binding domain* estão associadas à resposta imune contra patógenos. Estudos recentes demonstraram claramente que as ROPs estão envolvidas na mediação das vias de resposta de defesa das plantas, incluindo a resistência a doenças. O arroz (*Oryza sativa* L.) tem sido estudado detalhadamente nesse sentido, além dos trabalhos

realizados em soja , tabaco , milho e cevada (Agrawal; Iwahashia; Rakwal, 2003). Durante a interação planta-patógeno, as proteínas Rho GTPases desempenham um papel importante na regulação da reorganização do citoesqueleto e na formação de estruturas especializadas de defesa.

A regulação fina da atividade das proteínas Rho GTPases por suas reguladoras, como a proteína ativadora de Rho GTPase com domínio PAK-box/P21-Rho-binding, é crucial para garantir uma resposta imune eficaz sem comprometer o crescimento e desenvolvimento normais da planta. Alterações na regulação das proteínas Rho GTPases e de suas reguladoras podem levar a distúrbios na resposta imune da planta e na suscetibilidade a patógenos. Portanto, essas proteínas desempenham um papel crítico na interação planta-patógeno e na resistência das plantas contra doenças.

As proteínas quinases de serina/treonina são especialmente importantes na regulação de respostas a estresses bióticos (causados por organismos vivos, como patógenos) e abióticos (como temperatura, luz e nutrientes). Elas desempenham um papel fundamental na ativação de respostas de defesa contra patógenos, incluindo a ativação de genes de resistência e a indução de respostas de hipersensibilidade, que são mecanismos importantes na resistência das plantas a doenças proteínas RLK envolvidas na interação planta-patógeno e respostas de defesa (Afzal; Wood; Lightfoot, 2008)

O gene Thecc.05G190000 que codifica para a *ATP binding* possui a capacidade de ligação ao ATP pode estar relacionada à defesa vegetal, especialmente em proteínas envolvidas em processos metabólicos ou de sinalização associados à resposta imune das plantas contra patógenos. Por exemplo, muitas proteínas *quinases* envolvidas na cascata de sinalização da resposta imune vegetal têm a capacidade de ligar-se e utilizar o ATP como substrato para fosforilar outras proteínas, ativando assim uma série de respostas de defesa. Além disso, algumas proteínas transportadoras de ATP também desempenham um papel importante no transporte de energia necessária para processos de defesa, como a síntese de compostos de defesa.

A proteína da família de fatores de transcrição AP2/B3-like (AP2/B3-like transcriptional factor family protein) é um tipo de fator de transcrição encontrado em plantas. Os fatores de transcrição AP2/B3-like são conhecidos por desempenhar papéis importantes na regulação da expressão gênica em resposta a uma variedade de sinais ambientais.

Na defesa vegetal, os fatores de transcrição AP2/B3-like pode estar envolvidos na regulação da expressão de genes relacionados à resposta a patógenos. Eles podem ativar ou reprimir a expressão de genes envolvidos na síntese de proteínas de defesa, na produção de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas ou na sinalização celular relacionada à resposta imune das plantas.

Os genes Thecc.05G218400, Thecc.05G274900 e Thecc.05G275200 codificam para a proteína *Disease resistance family protein* / LRR family protein e a "LRR family protein" são categorias de proteínas encontradas em plantas que desempenham papéis importantes na resposta imune das plantas contra patógenos. As proteínas envolvidas no desenvolvimento ou defesa das plantas dividem-se principalmente em dois grandes grupos. O grupo principal contém membros que pertencem à classe NBS-LRR, estes codificam proteínas intracelulares com motivos de receptor LRR combinados com uma sequência prevista do local de ligação de nucleotídeos. (Afzal; Wood; Lightfoot, 2008)

Disease resistance family protein, esta categoria inclui proteínas que são ativadas em resposta à infecção por patógenos e desencadeiam uma resposta de defesa. Elas são frequentemente divididas em diferentes subgrupos com base em suas estruturas e mecanismos de ação. Por exemplo, algumas proteínas podem ter um domínio NB-ARC, que está envolvido na ligação de nucleotídeos e sinalização, enquanto outras podem ter domínios de repetição rica em leucina (LRR), que estão envolvidos no reconhecimento de patógenos.

LRR family protein possuem domínios de repetição rica em leucina (LRR) são comumente encontradas em proteínas de resistência a doenças em plantas. Esses domínios são responsáveis pelo reconhecimento de patógenos, permitindo que a planta identifique a presença de um patógeno específico. Após o reconhecimento, essas proteínas desencadeiam uma resposta de defesa que pode incluir a produção de compostos antimicrobianos, a ativação de genes de defesa e a morte celular programada ao redor do local da infecção para limitar a propagação do patógeno.

A seleção das proteínas acima foi realizada selecionando as que estão associadas ao processo de defesa da plana. No entanto é necessário ressaltar que um estudo completo e robusto foi realizado identificando diversos genes estão associados também as rotas de sinalização outras vias indiretas de mecanismos de defesa da planta.

6.5 Identificação de regiões de recombinação

Para identificar genes candidatos à resistência contra a doença da podridão-parda, examinamos árvores exibindo eventos de recombinação para ambos os haplótipos parentais dentro da região QTL e entre marcadores SNP flanqueadores. A análise dos haplótipos parentais revelou que a resistência à doença da podridão-parda é herdada do haplótipo materno ('TSH 1188'). Descobrimos eventos de recombinação para pelo menos os haplótipos parentais ocorrendo em cinco locais genômicos distintos, mas alguns eventos de recombinação ocorreram nos mesmos locais. Perto desses eventos recombinantes, encontramos genes importantes relacionados a processos de mecanismos de defesa bem conhecidos durante interações planta-patógeno.

7. CONCLUSÃO

O estudo foi realizado com o objetivo de mapear QTL com base em SNP que estão associados à resistência do cacau à podridão-parda. O número de frutos que não desenvolveram a doença após a inoculação foi a variável significativa para selecionar genótipos resistentes da população MP01. Sendo assim, pode ser utilizada para posterior seleção de novas variedades. Os marcadores SNP associados a resistência a patógenos foram utilizados para rastrear e selecionar variedades de alta resistência através da seleção assistida por marcadores e seleção genômica. A identificação dos QTLs combinada com as informações dos eventos de recombinação nessas regiões de QTL ajudou a identificar modelos genéticos candidatos que afetam a variação fenotípica da resistência genética. Esses genes candidatos não são necessariamente específicos apenas para resistência a podridão-parda, pois podem ter múltiplas funções, mas certamente contribuem para a resistência a patógenos em outras culturas. Os nossos estudos indicam que esses genes são importantes para compreender os mecanismos de resposta molecular de defesa em *T. cacao* sendo esses os principais genes candidatos relacionados com a resposta imune da planta quanto ao ataque de *Phytophthora*.

8. REFERÊNCIAS

Agrawal GK, Yonekura M, Iwahashi Y, Iwahashi H, Rakwal R. (2005) System, trends and perspectives ofproteomics in dicotplants: Part I: **Technologies in proteome establishment.** J Chromat B 815: 109-123.

Aime, M. C., & Phillips-Mora, W. (2005). **The causal agentsofwitches' broomandfrostypodrotof cacao (chocolate, Theobroma cacao) form a new lineage ofMarasmiaceae. Mycologia**, 97, 1012-1022.

Alexandra, L.; Quinga, P. (Inserir Ano). **Embriogênese somática, metilação do DNA e proteômica em quatro genótipos de *Theobroma cacao* L. do Equador.** Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Disponível em: <URL>. Acesso em: 15 jan. 2024.

Alexopoulos, C. J.; Mims, C. W.; Blackwell, M. B. (1986). **Introductorymycology**. 4.ed. New York: J. Wiley.

Argout, X., Salse, J., Aury, J. M., et al. (2011). **The genomeof Theobroma cacao.** Nat Genet, 43, 101–108.

Argout, X., Salse, J., Aury, JM. et al. **The genome of *Theobroma cacao***. Nat Genet 43, 101–108 (2011).

Bates, D, Mächler, M, Bolker, B & andador, S. **Ajustando modelos lineares de efeitos mistos usando lme4**. J. Stat. Suave (2015)

Bioci, R. (2011). **O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas**. Porto Alegre: Revista Brasileira de Biociências.

Boza, E. J.; Irish, B. M.; Meerow, A. W.; Tondo, C. L.; Rodriguez, O. A.; Ventura-López, M.; Gómez, J. A.; Moore, J. M. (2012). **Geneticdiversity, conservation, andutilizationof*Theobroma cacao* L**.; geneticresources in theDominicanRepublic. GeneticResourcesandCrop Evolution, 60(2), 605-619.

Bravo J, Campo S, Murillo I, Coca M, San Segundo B. **Acúmulo de mRNA induzido por fungos e feridas contendo uma quitinase de classe II da família da proteína 4 (PR-4) do milho relacionada à patogênese.** Planta Mol Biol. 2003; 52 (4):745–759.

Britto DS, Pirovani CP, Andrade BS, Dos Santos TP, Pungartnik C, Cascardo JC, Micheli F, Gesteira AS. **Recombinant β-1,3-1,4-glucanase from Theobroma cacao impairs Moniliophthora perniciosa mycelial growth**. Mol Biol Rep. 2013 Sep;40(9):5417-27. doi: 10.1007/s11033-013-2640-1. Epub 2013 May 13. PMID: 23666150.

Brown, J. S., Schnell, R. J., Motamayor, J. C., Lopes, U., Kuhn, D. N., &Borrone, J. W. (2005). **Resistance gene mapping for witches' broomdisease in *Theobroma cacao* L**. in an F2 102 populationusingmicrosatellitemarkersand candidate genes. J Am SocHorticSci.

Brown, J.S.; Schnell, R. J.; Motamayor, J. C.; Kuhn, D. N.; Borrone, J. W.;. **Resistance Gene Mapping for Witches' Broom Disease in Theobroma cacao L. in**

an F2 Population using SSR Markers and Candidate Genes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 130(3):366-373. 2005

Carneiro, M. S.; Vieira, M. L. C. (2002). **Mapas genéticos em plantas**. Bragantia, 61(2), 89-100.

Caruso C, Chilosi G, Caporale C, Leonardi L, Bertini L, Magro P, Buonocore V. **Indução de proteínas relacionadas à patogênese na germinação de sementes de trigo infectadas com Fusarium culmorum .** Ciência das Plantas. 1999; 140 (1):87–97.

Chen, M. S. (2008**). Inducible direct plantdefenseagainstinsectherbivores**: A review. Insect Science, 15, 101-114.

Conheça os maiores produtores de cacau do mundo – **Sistema FAEB**. Disponível em: <https://sistemafaeb.org.br/conheca-os-maiores-produtores-de-cacau-do-mundo/>.

Constabel, C. P., & Ryan, C. A. (1998). **A surveyofwound- andmethyljasmonate-inducedleafpolyphenol oxidase in cropplants. Phytochemistry**, 47, 507-511.

DECLOQUEMENT, J. et al. *Phytophthora theobromicola* sp. nov.: **A New Species Causing Black Pod Disease on Cacao in Brazil. Frontiers in Microbiology**, v. 12, 15 mar. 2021.

Decloquement, J., Ramos-Sobrinho, R., Elias, S. G., Britto, D. S., Puig, A. S., Reis, A., Silva, R. A. F., Honorato-Júnior, J., Luz, E. D. M. N., Pinho, D. B., Marelli, J. P. (2021). ***Phytophthora theobromicola* sp. nov.: A new speciescausing black poddiseaseoncacao in Brazil. Frontiers in Microbiology**, 12, 1-15. (https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.537399).

Elvira, M. I., Galdeano, M. M., Gilardi, P., García-Luque, I., & Serra, M. T. (2008). **Proteomicanalysisofpathogenesis-related proteins (PRs) inducedbycompatibleandincompatibleinteractionsofpeppermildmottlevirus (PMMoV) in Capsicumchinense L3 plants**. Journalof Experimental Botany, 59(6), 1253-1265.

Emidio, N. B., et al. (2015). **Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações**. HU Revista, 41(3 e 4).

Engelbrecht, C. J., Harrington, T. C. (2005). **Intersterility, morphologyandtaxonomyof Ceratocystis fimbriata onsweetpotato, cacao andsycamore. Mycologia**, 97(1), 57-69. doi: 10.3852/mycologia.97.1.57.

Faleiro, F., et al. (2003). **Caracterização de linhagens endogâmicas recombinantes e mapeamento de locos de características quantitativas associados a ciclo e produtividade do feijoeiro-comum.** Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 38(12), 1387–1397.

Faria, JC, Jelihovschi, POR EXEMPLO & Allamán, BI. **Tabelas de distribuição de frequência, histogramas e polígonos** (2018).

Fernandes, L. Dos 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, 14 fev. 2018.

G. ANURAG UTTAM et al. Molecular mapping and candidate gene analysis of a new epicuticular wax locus in sorghum (Sorghum bicolor L. Moench). **Theoretical and Applied Genetics,** v. 130, n. 10, p. 2109–2125, 12 jul. 2017.

Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P. C., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., &Job, D. (2001). **ProteomicanalysisofArabidopsisseedgerminationandpriming**. Plant Physiol, 126, 835-848.

Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., & Weiss, W. (2000). **The currentstateoftwo-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.**Electrophoresis, 21, 1037–1053.

GUEST D. 2007. **Podridão-parda: diversos patógenos com impacto global na produção de cacau.** Fitopatologia 97:1650-1653.

Hancock, J. M. (2000). **Microsatellitesandothersimplesequences: genomiccontextandmutationalmechanisms.** In: Goldstein, D. B.; Schlotterer, C. (Eds.), Microsatellites. Evolution andapplications. New York, Oxford University Press, 1-9.

Haverkort, A. J., Struik, P. C., Visser, R. G. F., & Jacobsen, E. (2009). **Applied biotechnologytocombat late blight in potatocausedby*Phytophthora infestans***. PotatoResearch, 52, 249–264. (https://doi.org/10.1007/s11540-009-9136-3).

J.C. Motamayor, K. Mockaitis, J. Schmutz, N. Haiminen, D.L. III, O. Cornejo, S.D. Findley, P. Zheng, F. Utro, S. Royaert, C. Saski, J. Jenkins, R. Podicheti, M. Zhao, B.E. Scheffler, J.C. Stack, F.A. Feltus, G.M. Mustiga, F. Amores, W. Phillips, J.P. Marelli, G.D. May, H. Shapiro, J. Ma, C.D. Bustamante, R.J. Schnell, D. Main, D. Gilbert, L. Parida, D.N. Kuhn, **The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color, Genome** Biol. 14 (2013) r53. doi:10.1186/gb-2013-14-6r53.

Jenks MA, Joly RJ, Peters PJ, Rich PJ, Axtell JD, Ashworth EN (1994**) Mutação da cutícula induzida quimicamente que afeta a condutância epidérmica ao vapor de água e a suscetibilidade a doenças em *Sorghum bicolor (L.)*** Moench. Fisiol Vegetal 105:1239–1245

Kamoun, S., et al. (2015). **The Top 10 oomycetepathogens in molecular plantpathology**. Molecular Plant Pathology, 16(4), 413–434 (https://doi.org/10.1111/mpp.12190).

Kasuga S, Inoue N, Kaidai H, Watanabe H (2001) **Efeitos da nervura central marrom e genes sem floração na resistência à ferrugem da bainha** (Rhizoctonia solani Kuehn) no sorgo. J Jpn Soc Grassl Sci 46:28–33

KIM, M. C. et al. **Calcium and Calmodulin-Mediated Regulation of Gene Expression in Plants.** Molecular Plant, v. 2, n. 1, p. 13–21, jan. 2009.

Kroon, L. P. N. M., Brouwer, H., De Cock, A. W. A. M., &Govers, F. (2018). **The genus *Phytophthora* anno 2012. Phytopathology**, 102(4), 348-364.

Lanaud, C., Fouet, O., Clément, D., et al. (2009). **Uma análise meta-QTL de características de resistência a doenças de *Theobroma cacao L*.** Mol Breeding, 24, 361–374

LANAUD, Claire et al. **Um mapa de ligação genética de *Theobroma cacao* L.** Theoretical and Applied Genetics , v. 987-993, 1995.

LESSA, I. Z. V. et al. **Morfologia e agressividade de isolados de *Phytophthora palmivora* de cacaueiro no estado da Bahia**. Summa Phytopathologica, v. 46, n. 3, p. 228–235, set. 2020.

Lessa, I. Z. V.; Luz, E. D. M. N.; Magalhães, D. M. A.; Bezerra, J. L.; Pires, J. L. (2020). **Morfologia e agressividade de isolados de *Phytophthora* palmivora de cacaueiro no estado da Bahia**. Summa Phytopathologica, 46(3), 228-235.

Linthorst, H. J. M. (1991). **Pathogenesisrelated proteins ofplants**. Critical Reviews in Plant Science, 10, 123-150.

LIVINGSTONE, D. et al. **Making a chocolate chip: development and evaluation of a 6K SNP array forTheobroma cacao.** v. 22, n. 4, p. 279–291, 11 jun. 2015.

Mann, M., Hendrickson, R. C., &Pandey, A. (2001). **Analysisof proteins andproteomesbymassspectrometry**. Ann RevBiochem, 70, 437-473.

MCCORMACK, E.; BRAAM, J**. Calmodulins and related potential calcium sensors of Arabidopsis.** New Phytologist, v. 159, n. 3, p. 585–598, 1 set. 2003.

Nascimento, A., et al. (2019). **Transferibilidade e mapeamento de microssatélites entre *Theobroma cacao* L. e Theobroma grandiflorum (Willd. exSpreng.)**Schum. Agrotrópica (Itabuna), 31(2), 85–102.

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2011). **Princípios de Bioquímica de Lehninger** (5a Ed.).

NYASSÉ, S.; DESPRÉAUX, D.; CILAS, C. **Validity of a leaf inoculation test to assess the resistance to *Phytophthora megakarya* in a cocoa** (Theobroma cacao L.) diallel mating design. Euphytica, v.123, p.395-399, 2002.

PEREIRA MENEZES, S. et al. **The pathogenesis-related protein PR-4b from Theobroma cacao presents RNase activity, Ca2+ and Mg2+ dependent-DNase activity and antifungal action on Moniliophthora perniciosa.** BMC Plant Biology, v. 14, n. 1, 11 jun. 2014.

REIS, A. et al. **Espécies fitopatogênicas de Phytophthora. Revisão Anual de Patologia de Plantas,** p. 56–78, 2023

Reis, A., de Souza Feitosa, M. I., Luz, E. D. N., & dos Santos, Á. F. **ESPÉCIES FITOPATOGÊNICAS.**

Royaert, S., Jansen, J., da Silva, DV et al. **Identificação de genes candidatos envolvidos na resistência à doença da vassoura de bruxa em uma população de mapeamento segregante de *Theobroma cacao L*.** no Brasil. Genômica BMC 17 , 107 (2016).

Souza, A. S. L. Avaliação da estabilidade térmica e oxidativa de chocolates amargos. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2010.

Tan X, Yan S, Tan R, Zhang Z, Wang Z, Chen J (2014) **Caracterização e expressão de um gene de lipase semelhante a GDSL de Brassica napus em *Nicotiana benthamiana*. Proteína** J 33:18–23

Weibel D, Starks K (1986) **Não preferência de Greenbug por sorgo sem floração.** Colheita Sci 26:1151–1153

9. CAPITULO 2

Identificação de proteínas de resposta do *Theobroma cacao* relacionadas com o mecanismo de defesa a *Phytophthora theobromicola*

RESUMO

Theobroma cacao L. é uma planta de grande importância econômica devido à utilização de suas amêndoas na produção de diversos produtos nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. No entanto, essa cultura é frequentemente afetada por diversas doenças, como a podridão-parda, que é causada pelo oomiceto *Phytophthora* spp., que provoca lesões em diversos órgãos da planta. Quando atinge os frutos, causa danos significativos às amêndoas, resultando em perdas significativas nas plantações de cacau. Este estudo teve como objetivo avaliar três genótipos de cacau com características contrastantes: FB 206 (suscetível), TSH 1188 (moderadamente resistente) e CCN 51 (resistente), a fim de investigar a interação planta-patógeno em nível molecular. Para isso, realizou-se a análise proteômica para avaliar o acúmulo de proteínas de defesa em diferentes tempos de inoculação (0h, 24h e 96h) para o patógeno *P. theobromicola*. O objetivo foi verificar se os genótipos selecionados estão de acordo com as características previamente descritas na literatura para susceptibilidade ou resistência à doença bem como inferir se as proteínas de defesa encontradas poderão ser utilizadas posteriormente no melhoramento genético do cacaueiro, visando obter um clone de alta resistência a podridão-parda. Como resultados encontrados foi possível identificar acúmulos de diferentes proteínas relacionadas a com a interação planta-patógenos. Dessa forma, conclui-se que ocorre uma defesa expressiva por parte da planta quando em contato com o patógeno, especialmente em clones com caracteristicas de susceptibilidade.

Palavras- chaves: Proteômica; proteínas de defesa; *Phytophthora* spp.

ABSTRACT

Theobroma cacao L. is a plant of great economic importance due to the use of its beans in the production of various products in the pharmaceutical, cosmetic, and food industries. However, this crop is often affected by various diseases, such as witches' broom, cocoa swollen shoot, and black pod rot. Black pod rot, the focus of this study, is caused by the oomycete *Phytophthora* spp., which causes lesions in various plant organs. When it affects the fruits, it causes significant damage to the beans, resulting in substantial losses in cocoa plantations. This study aimed to evaluate three cocoa genotypes with contrasting characteristics: FB206 (susceptible), TSH 1188 (moderately resistant), and CCN x'x51 (resistant), in order to investigate the plant-pathogen interaction at the molecular level. For this purpose, proteomic techniques were used to analyze the accumulation of defense proteins at different inoculation times (0h, 24h, and 96h) for the pathogen *P. theobromicola*. The objective was to verify if the selected genotypes are in accordance with the characteristics previously described in the literature for susceptibility or resistance to the disease, as well as to infer if the defense proteins found could be used later in cocoa breeding programs to obtain a highly resistant clone to black pod rot.

Keywords: Proteomics; defense proteins; *Phytophthora* spp.

1. INTRODUÇÃO

Theobroma cacao L., popularmente conhecido como cacau, é considerada uma planta de importância comercial devido à utilização das suas amêndoas para fabricação de chocolate e outros derivados destinados para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas. A organização Internacional do Cacau catalogou uma produção mundial de cacau de 4,8 milhões de toneladas durante o período de 2018 e 2019, sendo considerados os principais País produtor de cacau é a Costa do Marfim. Os Países Gana, Equador, Camarões e o Brasil, sétimo maior produtor, reúnem 88,4% da produção mundial ("Conheça os maiores produtores de cacau do mundo – Sistema FAEB", 2024). Existem fatores que afetam diretamente essa a produtividade da cultura, sendo um dos principais problemas as doenças provocadas por diferentes patógenos, como *Moniliophthora perniciosa*, *Ceratocystis* e *Phytophthora*. A podridão-parda, causada pelo oomiceto *Phytophthora*, provoca perdas de 20 a 30% das perdas anuais na lavoura cacaueira (Oliveira & Luz, 2005). Diversas espécies de *Phytophthora* infectam cacau, entre elas pode-se identificar P. *palmivora*, P. *theobromicola*, P. *capsici*, P. *megakarya*, P. *citrophthora*, P. *megasperma e* P. *cinnamomi.* No Brasil, as únicas espécies catalogadas do gênero são *P. palmivora*, *P. capsici*, *P. citrophthora* e *P. theobromicola* (Decloquement, 2021).

Phytophthora é um oomiceto hemibiotrófico, cuja parede celular é formada por ß-glucanas, prolina e celulose. Seu ciclo de vida é predominantemente diploide, e ao entrar em contato com um órgão suscetível, provoca a colonização do hospedeiro, modulando suas defesas por meio de proteínas efetoras de doenças. A resposta do hospedeiro à infecção resulta no aparecimento de uma lesão arredondada de coloração marrom que se desenvolve rapidamente, levando à necrose do tecido infectado. A doença da podridão parda pode ser controlada por métodos físicos, como a remoção dos frutos infectados, e a utilização de tratos culturais que visam impedir a disseminação da doença. Associar essas práticas a métodos de controle químico, biológico e genético possibilita um manejo integrado para o controle da doença em cultivos de cacaueiro (Magnanan et al., 2006; Zhang e Motilal, 2016). A utilização de cultivares de cacau com resistência tem se mostrado uma opção efetiva no controle da doença (Barreto et al., 2015). Contudo, é importante ressaltar que muitas das variedades cultivadas ainda apresentam característica de susceptibilidade ao *Phytophthora* (Bonfim et al., 2022).

Desvendar os mecanismos moleculares envolvidos entre a interação cacau/*P. theobromicola* é indispensável uma vez que esse patógeno ainda é pouco conhecido e percebe-se diante das observações fenotípicas que o seu nível de agressividade é maior quando comparado com *P. palmivora*, por exemplo (Decloquement, 2021). Para compreender as peculiaridades desse patossistema. Estudos sobre essa interação planta-patógeno têm se concentrado em diferenças anatômica/histológicas, genes, enzimas e metabólitos de influências diversas na resistência a podridão-parda (Bailey et al., 2016 ; Gu et al., 2020). Porém, as questões relacionadas a nível proteômico podem ser abordadas apenas devido aos níveis de regulação gênica e modificações pós-traducionais. (Quirino et al., 2010). Essas análises fornecem informações sobre os mecanismos moleculares de resistência a plantas (Geddes et al., 2008).

A identificação de proteínas de resistência a doenças é importante não apenas para desvendar a interação molecular do patossistema, mas também para desenvolver novos métodos, mais específicos e eficazes, de combate ao fitopatógeno. O presente trabalho teve como objetivo analisar diferenças quantitativas referentes ao acúmulo de proteínas relacionadas à defesa vegetal para os genótipos de cacau com características de susceptibilidade e resistência ao patógeno *Phytophthora theobromicola*.

Neste estudo, conduzimos experimentos com abordagem proteômica visando identificar proteínas potencialmente relacionadas com a resistência do cacaueiro à podridão-parda. O objetivo foi desvendar as bases moleculares do patossistema nos estágios iniciais após infecção, entre 0 e 96h, quando ocorre o aparecimento dos sintomas, penetração do micélio e início da colonização do hospedeiro com indução de necrose. Os estudos foram conduzidos com três clones de cacau que apresentam diferentes graus de resistência à podridão-parda. Os clones de cacau FB206 (suscetível), TSH1188 (mediamente resistente) e CCN51 (resistente) foram inoculados com *P. theobromicola*, uma espécie recém-identificada, agressiva e ainda pouco estudada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Para as análises proteômicas, foram utilizados os mesmos genótipos avaliados no mapeamento genético: FB 206 (suscetível), TSH 1188 (mediamente resistente) e CCN 51 (resistente) (Figura 1). O órgão de estudo foi a casca do cacau inoculada com *P. theobromicola*. Os clones foram selecionados de uma área experimental em Barro Preto, Bahia, Brasil, no MCCS (Mars Centro de Ciência do Cacau), em condições de campo. A polinização foi executada de forma controlada para evitar a polinização cruzada, realizada três meses antes do início do experimento, para que os frutos atingissem o período de maturação estabelecido para o experimento (120 dias).

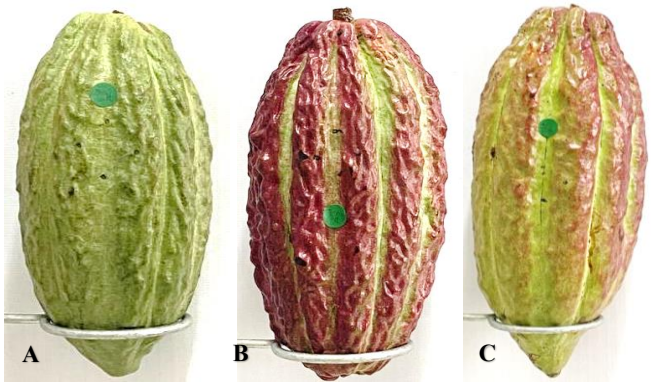

Figura 1: Genótipos de cacau utilizados na inoculação: FB206 **(A)** (susceptível), TSH1188 **(B)** (mediamente resistente) e CCN51 **(C)** (resistente), respectivamente com maturação de 120 dias após a inoculação.

2.2 Inoculação em laboratório

No desenvolvimento do trabalho de proteômica, as inoculações foram realizadas exclusivamente em laboratório devido à necessidade de um ambiente controlado. As coletas das amostras foram feitas em seis intervalos de tempo (0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas), onde foram medidas a altura e largura da lesão com o auxílio de um paquímetro e tabulados em Excel para observação da progressão da doença contudo para prosseguimento do trabalho foram selecionados apenas três tempos de inoculação (0, 24 e 96 horas), representando a avaliação da lesão em dias.

Os meios utilizados consistem em uma base de tomate para *P. theobromicola*. Após a preparação e autoclavagem dos meios conforme as recomendações, são inoculados com plugs de micélio dos patógenos. Esse processo ocorre dentro de uma capela de fluxo laminar para garantir a assepsia. Após a inoculação dos plugs de micélio

nos meios, as placas são incubadas em B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio) por 4 dias a uma temperatura de 25°C, em condições de escuro total. Após o crescimento dos micélios nas placas, estes são cortados em retângulos de 1 cm de largura e 1 cm de comprimento. Doze retângulos são então transferidos para placas de Petri de vidro e adicionados aos meios de cultura líquidos correspondentes a cada patógeno. As placas são incubadas em B.O.D 9 dias com luz fulltime. No dia seguinte, é realizado o estresse e a liberação dos zoósporos. As placas são selecionadas e submetidas ao primeiro estresse, que consiste em retirar o meio líquido das placas e retorná-las ao B.O.D. No dia seguinte, aplica-se o segundo estresse, que consiste em adicionar água gelada para a liberação dos zoósporos. As placas são mantidas sobre a bancada por 40 minutos a 1 hora, e em seguida a água é retirada e armazenada em tubos Falcon de 50 ml. Para a contagem dos zoósporos, uma alíquota de 20 microlitros da suspensão de zoósporos é retirada e vortexada para homogeneização. A alíquota é então aplicada em uma câmara de Neubauer para contagem dos zoósporos, e o inóculo é preparado ajustado a uma concentração de 7,5x10^5 (Reis et al., 2019).

O inóculo preparado é colocado sobre um lenço de papel umedecido, recortado com 1 cm de largura e 1 cm de diâmetro. O papel é então posicionado sobre o fruto com o auxílio de uma pinça de relógio, e aplicam-se 25 microlitros do inóculo sobre o papel. Os frutos são apoiados em suportes dentro de caixas plásticas, onde é criada uma câmara úmida. A temperatura e a umidade são controladas para favorecer o desenvolvimento dos patógenos. Para a realização da inoculação em laboratório, utilizou-se um total de 45 frutos inoculados para o patógeno *P. theobromicola*. Foram selecionados frutos com maturação de 120 dias para o experimento seguindo o mesmo padrão iniciado para o mapeamento de QTL.

As lesões identificadas nos frutos foram medidas com o auxílio de um paquímetro, observando-se a altura e a largura das lesões. Esses dados foram inseridos em um arquivo de Excel e, com o auxílio de uma fórmula, calculou-se a área das lesões.

2.3 Armazenamento das amostras

Para realizar a coleta das amostras de tecido da casca (Figura 2), apenas a região inoculada foi isolada com o auxílio de uma faca, removendo todas as partes que não apresentavam lesão e deixando apenas a casca infectada. Em seguida, a casca foi cortada em pedaços pequenos e armazenada em tubos Falcon de 50 ml, que foram imersos em

nitrogênio líquido. Após a imersão, as amostras foram armazenadas em um liofilizador (marca Christ- Beta 1-8 LO plus) por três dias.

Figura 2: Casca de cacau com estágio de maturação de 120 dias, inoculada com *P. theobromicola*

para os genótipos 'FB 206' (susceptível) 'TSH 1188' (mediamente resistente) 'CCN 51' (resistente).

2.4 Extração das proteínas totais das amostras da casca de cacau infectadas com *P. theobromicola*

Para a extração de proteínas totais, utilizou-se um *pool* de três repetições das amostras de casca de cacau infectadas com *P. theobromicola* e não infectadas para cada genótipo avaliado. O protocolo de extração para caule foi utilizado e adaptado para casca de cacau. Inicialmente, 1 g de biomassa liofilizada das amostras foi macerado com nitrogênio líquido e 0,07g de polivinilpirrolidona (PVPP), utilizando almofariz e pistilo, até obter um pó fino. Em seguida, as amostras foram distribuídas em tubos Eppendorf de 2 mL para lavagem. As amostras foram lavadas com ácido tricloroacético (TCA) 10% em acetona e incubadas a -20 °C overnight. No dia seguinte, as amostras foram novamente lavadas com TCA 10% em acetona e mais duas vezes com TCA 10% em água (com adição de β-mercaptoetanol), sendo necessário sonicação para remover a mucilagem (aplicando 5s ON, 10 s OFF a uma amplitude de 70%). As amostras foram então centrifugadas a 10.000 rpm, 4 °C, por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. A próxima lavagem foi realizada com acetona 80% (com adição de 0,5 microlitros de β-mercaptoetanol), repetindo os passos de sonicação e centrifugação. Os pellets foram secos em gelo em uma capela de fluxo por aproximadamente 15 minutos. Após a secagem, 40 microlitros de SDS-denso e 40 microlitros de β-mercaptoetanol foi adicionado às amostras, que foram sonicadas e em seguida foi adicionado fenol. As amostras foram

vortexadas, centrifugadas e o sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL. Em seguida, foi adicionada cinco vezes a quantidade de acetato de amônio e incubado a -20 °C overnight para precipitação das proteínas. No dia seguinte, as proteínas foram recuperadas por centrifugação, lavadas com acetato de amônio, acetona 80% e etanol 80%. Para armazenagem do pellet, foram adicionados 300 microlitros de tampão de ureia e armazenadas em -20 °C (Figura 3).

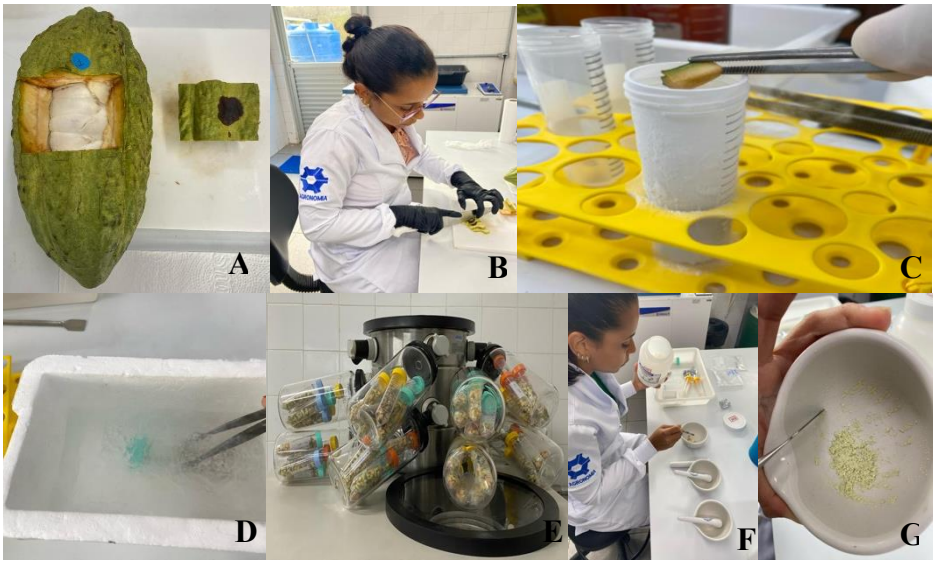

Figura 3: Metodologia para coleta da casca de cacau infectada com *P. theobromicola*. **A:** Separação da área infectada do restante do fruto; **B:** Corte em segmentos de 1 cm de largura e comprimento da casca de cacau inoculada; **C:** Imersão dos segmentos de casca em tubos Falcon de 50 ml com nitrogênio líquido; **D:** Imersão dos tubos Falcon, contendo as amostras; **E:** Liofilização das amostras; **F:** Maceração das amostras; **G:** Pó do tecido da casca após trituração;

2.5 Quantificação de proteínas totais e eletroforese em SDS-PAGE

Os extratos proteicos obtidos foram quantificados com o 2D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences), seguindo as recomendações do fabricante. O padrão utilizado foi diferentes concentrações de albumina do soro bovina (BSA), que serviu como base para gerar uma curva padrão de dosagem para a quantificação das amostras de cacau. Tanto a curva quanto as amostras foram preparadas em triplicata, usando microtubos do tipo Eppendorf de 2 mL. Inicialmente, foi adicionado a todos os microtubos (padrão e amostras) 300 µL de solução precipitante. Logo após, foram adicionados 6 µL das amostras ressuspensas em tampão de ureia e as concentrações correspondentes do padrão aos microtubos da curva, sendo brevemente homogeneizados em vortex. Seguiu- se as recomendações do fabricante para sua utilização. Logo após, as amostras foram

analisadas e observadas por gel SDS-PAGE (Dodecil Sulfato de Sódio - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida) onde foi corado com Comassie coloidal 0,08 % de acordo com Neuhoff et al. 1988. Foram utilizados 30 µg de cada amostra e a partir deste gel foi possível observar o perfil de bandas de proteínas totais.

2.6 Western blot

As amostras, aproximadamente de 30 µg cada, juntamente com 5µL de marcador de peso molecular (Kaleidoscope, pré-corado, Bio-Rad, EUA) foram então carregadas em géis de poliacrilamida a 12% contendo SDS, que foi submetido à corrida em amperagem constante de 60 mA até que a amostras alcançassem o final do gel. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, utilizando tampão de transferência gelado contendo trisma (25 mmolL-1), glicina (0,2 molL-1) e metanol (10%) durante 1:20 h em amperagem constante de 250 mA. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com corante Ponceau por 15 min para verificação da transferência. O corante foi então retirado e a membrana foi submetida à lavagem com TBS (Tris a 0,02 M, NaCl a 0,15M, pH 7,4) por 5 min e, em seguida, foi então incubada com solução de bloqueio dos sítios não ocupados durante 30 min à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi constituída a base de leite (10%) em TBS-T (tampão trisma-salina com tween 20 a 0,05%). Após este bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes com tampão + Twin por 15 minutos em cada lavagem em seguida foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: BIP, PR2, Catalase, ATP-syntase, durante 1 h, em agitação constante. Em seguida, a membrana foi submetida à lavagem com TBS (Tris a 0,02 M, NaCl a 0,15M, pH 7,4) por 15 min. Logo após, o anticorpo secundário foi conjugado a uma fosfatase alcalina (Anti-IgG de coelho), cuja incubação da membrana com este anticorpo foi feita em temperatura ambiente durante 1 h. Após incubação, a membrana foi novamente lavada, como descrito anteriormente, e incubada em 10 mL de solução contendo 1mL de tampão de substrato 10X (Tris 12,11 g, NaCl 5,84 g, MgCl2 1,02 g, H2O q.s.p. 80 mL, pH 9,5), 9 mL de água destilada deionizada, 25 µL de BCIP e 50 µL de NBT, na ausência de luz até o aparecimento da reação. Após revelação, o acúmulo relativo foi determinado a partir das imagens da membrana de nitrocelulose, utilizando o programa Gel Quant Net 8.0 (Figura 4).

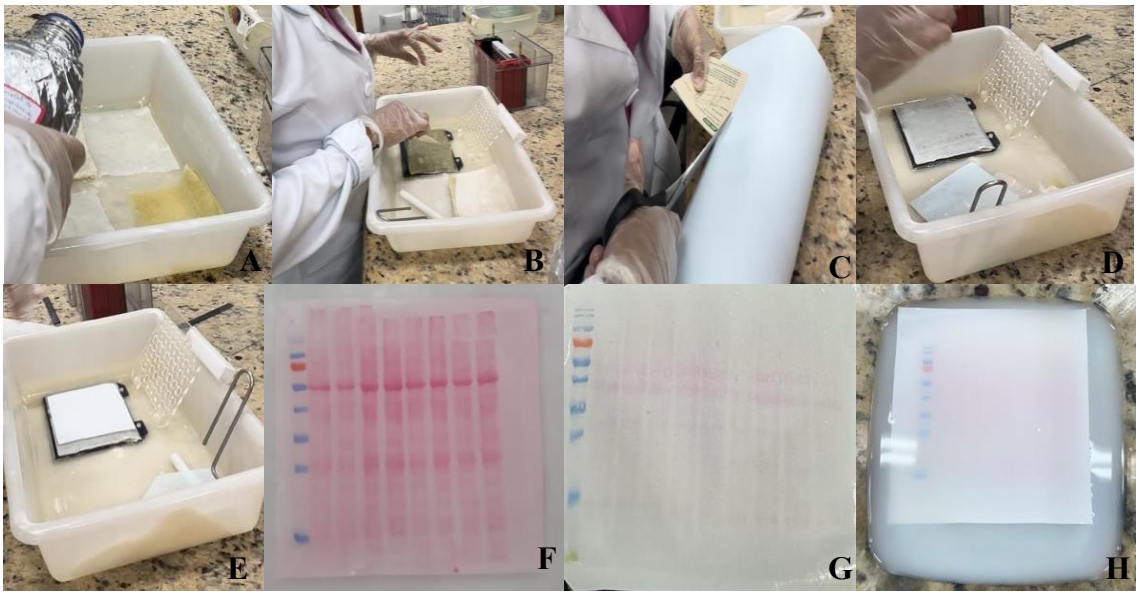

Figura 4: Metodologia para realização da técnica do Western Blot. **A:** Imersão dos acessórios em tampão de transferência; **B:** Montagem do 'sanduíche' de transferência; **C:** Corte da membrana para transferência do gel SDS-PAGE; **D:** Transferência do gel para o 'sanduíche'; **E:** Colocação da membrana de transferência sobre o gel; **F/G:** Membrana corada com Ponceau; **H:** Bloqueio da membrana com leite.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perfil proteico das amostras de cascas inoculadas e controle obtidos por meio de SDS-PAGE.

É possível avaliar o perfil proteico por meio do SDS-PAGE a 12,5% (Figura 5) apresentando bandas com massas moleculares distribuídas nas faixas entre14 e ~110 KDa, para as amostras de casca de cacau inoculadas e controle não inoculado em três diferentes genótipos, apresentando características contrastantes entre susceptibilidade e resistência, em diferentes tempos de inoculação. As amostras apresentaram uma distribuição de proteínas em todo o gel, o que possibilita inferir que houve uma grande quantidade de proteínas extraídas com qualidade, pois é possível observar as bandas de forma nítida, sem apresentar arraste durante a corrida do gel. Após a verificação da quantificação, procedeu-se a confecção do gel SDS-PAGE (Figura 5).

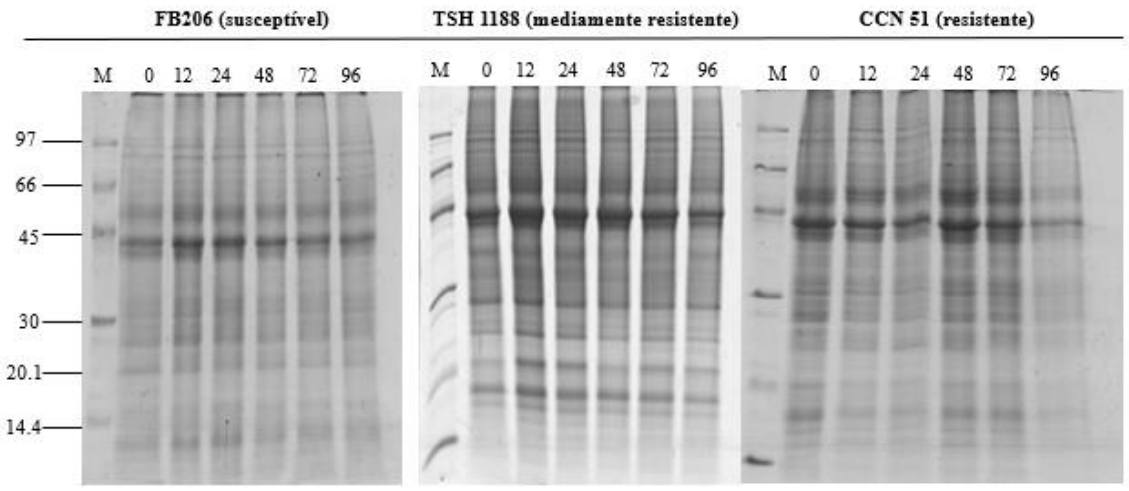

Figura 5: Perfil proteico das amostras de casca de cacau inoculadas com *P. theobromicola* em SDS-PAGE. Frutos de cacau submetidos aos tratamentos em diferentes tempos de inoculação. **M** – Marcador molecular; **0h** – controle; **12h** – (após inoculação); **24h** – (após inoculação); **48h** – (após inoculação); **72h** – (após inoculação) e **96h** – (após inoculação). kDa corresponde à massa molecular

3.2 Análise do acúmulo proteico por Western Blot

Os tempos selecionados para o estudo foram: 0h (controle - não inoculado), 24h (após inoculação) e 96h (após inoculação). A escolha desses tempos está relacionada ao tempo que a planta leva para modular suas primeiras proteínas de defesa em resposta à invasão do patógeno. A velocidade com que a planta identifica a invasão determina o tempo de resposta e desencadeia uma ou mais reações de defesa (Ryan et al., Bioci 2011).

Utilizou-se a técnica de Western Blot para observar o acúmulo de proteínas de defesa, e foi possível observar um acúmulo relacionados as proteínas PR-2, BIP, Catalase e ATP-sintase. Todas as proteínas avaliadas apresentaram um acúmulo significativo nas amostras inoculadas em diferentes tempos, quando comparadas com as amostras controle.

3.3 BidingImunnoglobulin Protein (BiP)

O gene BIP (BindingImmunoglobulin Protein) codifica uma chaperona residente no lúmen do retículo endoplasmático (RE). As chaperonas moleculares estão associadas à tolerância a fatores de estresses bióticos e abióticos, além de estarem ligadas à modulação de outras proteínas. (Alcântara, G. 2020). O RE é um local importante para a modificação e dobramento de proteínas secretoras e de membrana eucarióticas (Kim et al., 2008; Hetz, 2012).

O enovelamento de proteínas no RE é mediado principalmente por chaperonas e cofatores moleculares (Saijo, 2010). A proteína de ligação à imunoglobulina (BiP), é um membro da grande família HSP70 de acompanhantes moleculares, é uma acompanhante de alto peso molecular no RE (Bertolotti et al., 2000). Plantas em condições de estresse produziram uma maior síntese de proteínas relacionadas à resposta de defesa da planta. A BiP é um importante acompanhante do retículo endoplasmático e é sugerida para atuar como sensor primário na ativação das respostas proteicas desdobradas (UPR) (Kopp et al., 2019). Os BiPs desempenham um papel importante não apenas na UPR, mas também atuam regulando transdutores de estresse, como o fator de transcrição ativador 6 (ATF6), proteína quinase ER quinase semelhante a RNA (PERK) e enzima 1 que requer inositol (IRE1) (Jing et al., 2016).

A superexpressão desse gene em plantas que respondem a uma variedade de condições de estresses abióticos e bióticos. Além disso, níveis elevados de BiP foram associados a melhor resposta da planta ao estresse nutricional, aclimatação ao frio e elicitores de resposta a patogênese em plantas (CASCARDO et al., 2000; VALENTE et al., 2009).

Observando os resultados encontrados na revelação do western blot para BiP, é possível identificar um maior acúmulo nos tempos 24h (após inoculados) nos genótipos FB206 (susceptível) e CCN 51(resistente). A ativação da resposta de BiP (proteína de ligação a imunoglobulinas) pode ocorrer rapidamente após o primeiro momento de infecção por um patógeno, pois geralmente a resposta imunológica das plantas pode ser

ativada em questão de minutos a horas após o reconhecimento do patógeno. Como a BiP é uma chaperona relacionada à resposta imune das plantas nas primeiras horas após a infecção, sinais são emitidos para a produção de proteínas subsequentes, modulando outras proteínas de defesa da planta para combater o avanço do patógeno.

No tempo subsequente 96h (após inoculado), o acúmulo de BiP é diminuído, uma vez que outras proteínas estão sendo expressas para conter o avanço da doença, conservar energia e manter o equilíbrio celular. É possível observar um aumento de outras proteínas, comparando o resultado encontrado para a BiP com o resultado encontrado para a PR2. O maior acúmulo de outra proteína de resistência ocorre às 96 horas após o contato com o patógeno, quando a β-1,3 glucanase passa a ser modulada em resposta a um maior tempo de infecção pelo patógeno.

Estudos mostram que dois fatores de transcrição NAC, NTP1 e NTP2, estão localizados na membrana do RE e contribuem para a resistência do tabaco contra *P. infestans*. O efetor Pi03192 de *P. infestans* interage com NTP1 e NTP2 e evita sua transmissão do RE para o núcleo, diminuindo assim a patogenicidade de *P. infestans* para batata e *N. benthamiana* (McLellan et al., 2013). Além disso, o PsAvh262 de *P. sojae* pode estabilizar BiPs e facilitar infecções por *Phytophthora* (Jing et al., 2016). Isso pode ser associado ao resultado encontrado no genótipo CCN51 (resistente), onde a quantidade de BiP expressa não é tão significativa, uma vez que as características de resistência conferidas por esse clone impedem o avanço de *P. theobromicola* de forma agressiva (Figura 6).

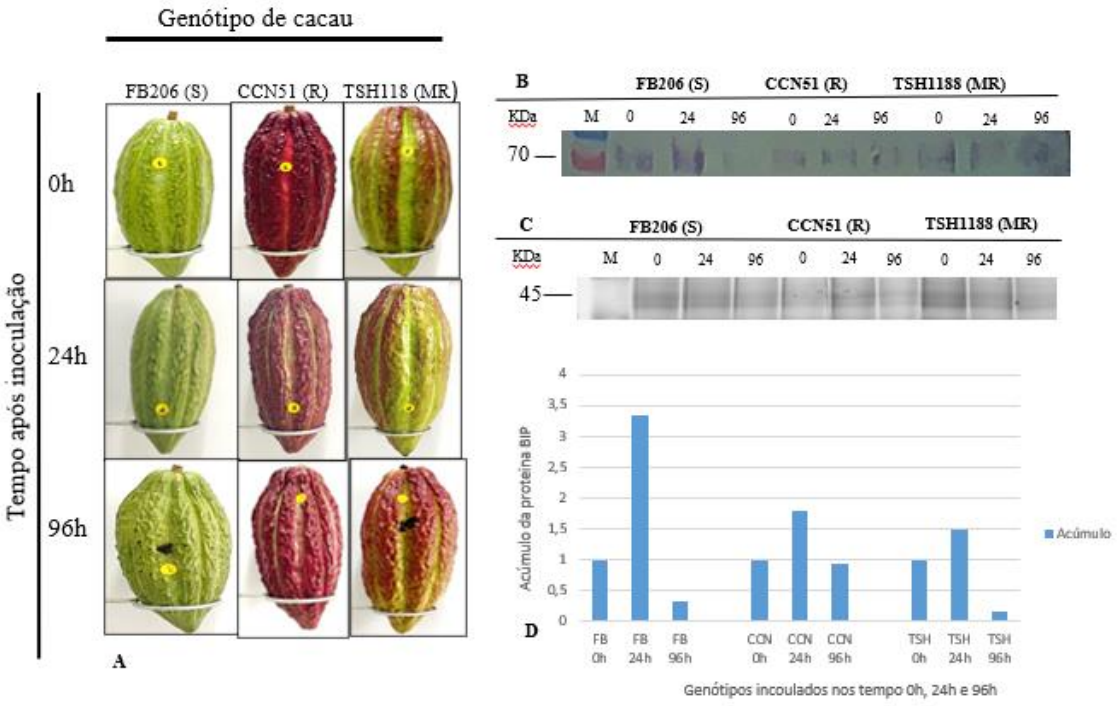

Figura 6: A: Painel dos genótipos de cacau inoculado nos tempos 0h (não inoculado), 24h (após inoculado) e 96h (após inoculados) com *P. theobromicola*. **B:**Western blot dos genótipos inoculados nos tempos para a proteína BIP. **C:** Gel espelho. **D:** Gráfico de acúmulo da proteína BiP (BidingImunnoglobulin Protein**)** determinado a partir de imagens da membrana de nitrocelulose, utilizando o Gel Quant. Software líquido 1.8.0.

3.4 ATP-SINTASE

A subunidade β-ATP sintase participa do transporte de prótons através da membrana, gerando um gradiente eletroquímico e regulando a síntese de ATP (Andersson et al., 2009). A ATP sintase é uma importante enzima envolvida no metabolismo energético das plantas, sintetizando ATP celular a partir de ADP e fosfato inorgânico (Yoshida et al., 2001). Por meio de um movimento de rotação direcionado pelo fluxo de prótons entre a membrana, gerado pela transferência de elétrons. O fluxo parte do lado fotoquímico positivo (alto potencial eletroquímico) para o lado fotoquímico negativo. A reação catalisada pela ATP sintase é completamente reversível (Futai, 2006; McCarty, 1992).

A ATP sintase é uma enzima importante na produção de ATP (trifosfato de adenosina), sendo a principal fonte de energia para diversos processos celulares. Durante um processo de ataque por parte do patógeno, o órgão afetado pode aumentar a produção de ATP visando fornecer mais energia para sintetizar compostos que possam atuar na defesa contra o ataque do patógeno e na produção de metabólitos essenciais.

No primeiro resultado é possível observar o acúmulo de ATP sintase em todas as amostras de cacau, inoculadas e não inoculadas. Ressalta-se que nas amostras de FB 206 (susceptível), TSH 1188 (mediamente resistente), CCN 51 (resistente) no tempo 0h (amostra não inoculada) é possível observar um acúmulo mais expressivo de ATP sintase. Esse resultado pode ser avaliado pelo fato de que em amostras controle a planta pode não está tendo sua homeostase perturbada, o que permite a manutenção da produção normal de ATP para as funções celulares essenciais, resultando em um nível relativamente mais alto de ATP sintase. Subsequentemente a esse resultado, o segundo acúmulo mais significativo ocorre na amostra de 24h (após inoculado), uma vez que a presença do patógeno pode desencadear uma resposta de defesa na planta, podendo promover a realocação de recursos e energia para a produção de moléculas de defesa e para a ativação de processos de sinalização. Isso pode resultar em uma redução na produção de ATP sintase e, consequentemente, em um menor acúmulo dessa enzima em comparação com a amostra controle.

Além disso, as amostras dos clones FB 206 (susceptível), TSH 1188 (mediamente resistente) e CCN5 1 (resistente), 96h (após inoculação), apresentaram um acúmulo menor de ATP sintase. Esse fato pode ser discutido analisando os clones quando infectados pelo patógeno, sendo sinalizadas diversas informações para conter o avanço do patógeno, é possível que essa sinalização demande um maior fluxo de energia, devido à necessidade de realocar recursos, ou seja, produzir moléculas de defesa e reparar possíveis danos causados pelo patógeno. A morte celular pode levar a uma maior liberação de ATP do meio intracelular para o meio extracelular, além da presença de ERO (espécies reativas de oxigênio) que provocam um estresse oxidativo. Como resposta a essa ação, o ATP é consumido na tentativa de neutralizar a ERO, resultando em uma diminuição na quantidade de ATP disponível (Figura 7).

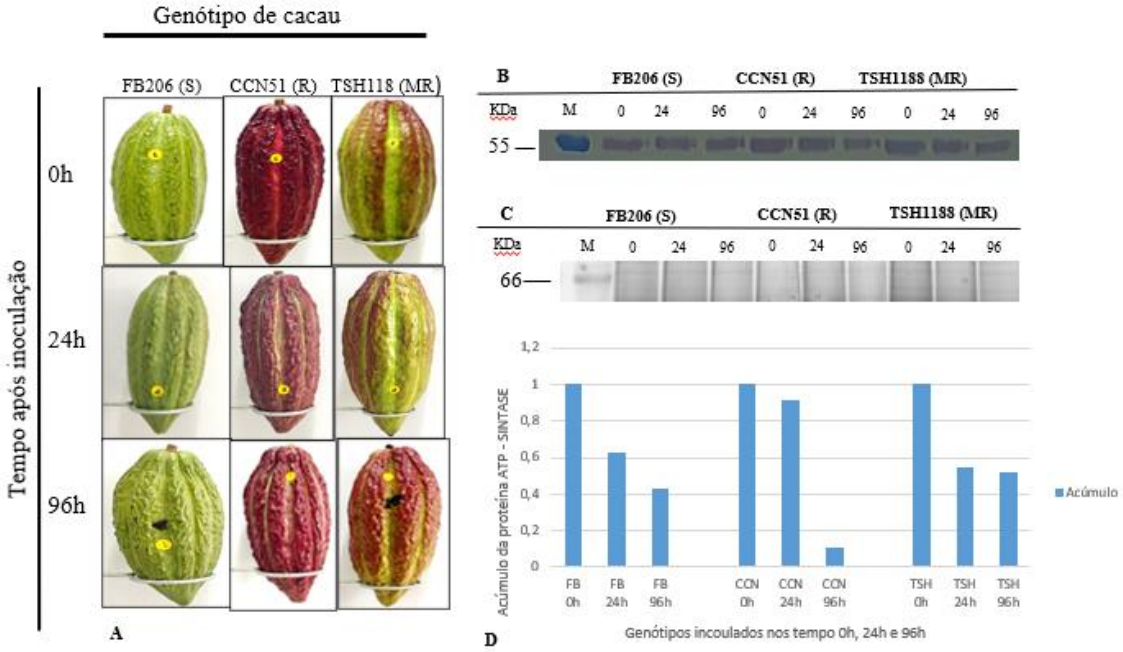

Figura 7: Painel dos genótipos de cacau inoculado nos tempos 0h (controle), 24h (após inoculado) e 96h (após inoculados) com *P. theobromicola*. **B:**Western blot dos genótipos inoculados nos tempos para a proteína ATP sintase. **C:** Gel espelho. **D:** Gráfico de acúmulo da proteína ATP sintase determinado a partir de imagens da membrana de nitrocelulose, utilizando o Gel Quant. Software líquido 1.8.0.

3.5 Catalase (CAT)

A catalase (CAT) é uma enzima que metaboliza espécies reativas de oxigênio (ERO) provocadas pelo estresse, controlando seus potenciais impactos no metabolismo e nas funções celulares (ANJUM et al., 2016). Para lidar com a produção de ERO, as plantas produzem uma série de enzimas para desintoxicá-las (Mittler, 2002; Dietz et al., 2016), sendo a catalase um exemplo. Sua reação comum é a dismutação de duas moléculas de H_2O_2 em água e O_2. Embora algumas catalases bacterianas usem manganês como cofator ativo redox, todas as formas eucarióticas conhecidas são baseadas em heme (Zamocky et al., 2008).

O acúmulo de catalase em todas as amostras, inoculadas e controle, evidencia a presença de peróxido de hidrogênio devido à ação de estresses, sejam eles provocados por fatores bióticos ou abióticos. Diante disso, é possível inferir que a enzima catalase está presente em todas as amostras avaliadas. Estudos mostram que algumas espécies de *Phytophthora*, como *P. sojae*, têm a capacidade de manipular a imunidade mediada pela

catalase. Os efetores PsCRN63/115 de *P. sojae* manipulam a morte celular programada da planta interferindo nas catalases e perturbando a homeostase do peróxido de hidrogênio (Zhang et al., 2015).

Além disso, o PsCRN63 também suprime a expressão de genes marcadores PTI (ImmunityInducedPathogen) induzida por flg22 (fragmento do flagelo bacteriano) e a deposição de calose (Liu et al., 2011; Li et al., 2016). O efetor PsCRN70 de *P. sojae*, que se localiza no núcleo da célula vegetal e funciona como um supressor universal da morte celular induzida por muitos elicitores, pode promover infecções por *Phytophthora* suprimindo o acúmulo de H_2O_2 e a produção de proteínas de defesa, incluindo as proteínas PR1a e PR2b relacionadas à patogênese (PR) (Rajput et al., 2014). Diante disso, é comum verificar aumento na atividade da enzima catalase não só quando as plantas são injuriadas por patógenos, mas também quando as plantas são expostas a outros tipos de estresse (Figura 8).

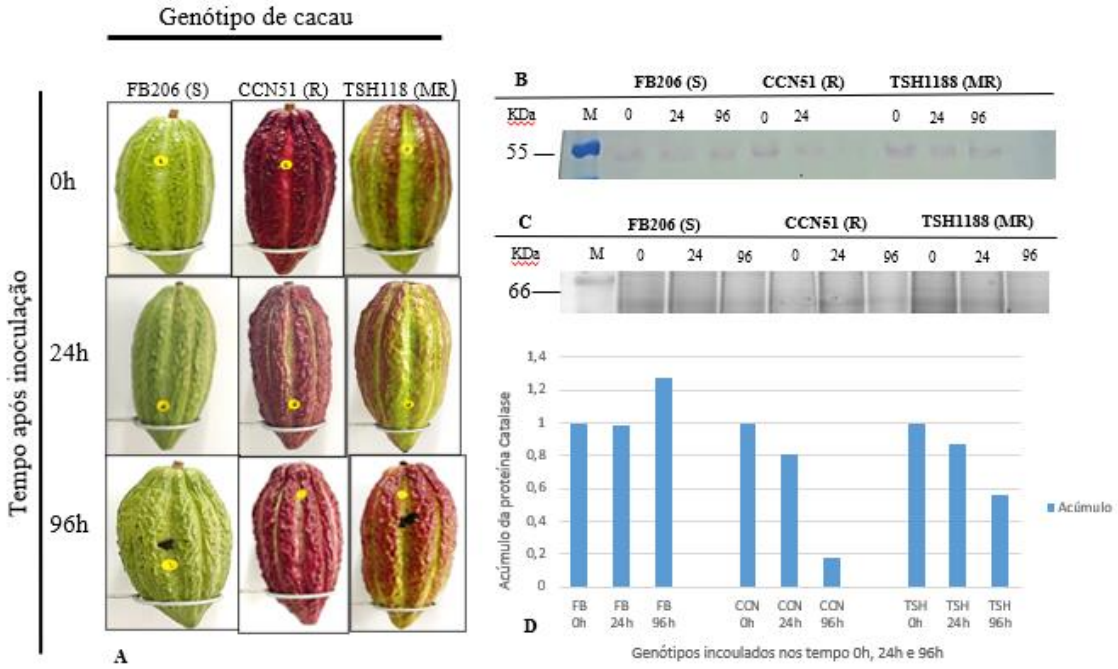

Figura 8:A: Painel dos genótipos de cacau inoculado nos tempos 0h (controle), 24h (após inoculado) e 96h (após inoculados) com *P. theobromicola*. **B:**Western blot dos genótipos inoculados nos tempos para a proteína Catalase. **C:** Gel espelho. **D:** Gráfico de acúmulo da proteína Catalase (CAT), determinado a partir de imagens da membrana de nitrocelulose, utilizando o Gel Quant. Software líquido 1.8.0.

3.6 β-1,3 glucanases (PR2)

As proteínas do grupo PR são classificadas em 17 famílias, caracterizadas pela solubilidade em meio ácido, baixo peso molecular e resistência a proteases (Linhorst, 1991; et al., Bioci 2011). As β-1,3 glucanases (PR2) são enzimas abundantes que estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, especialmente na defesa vegetal. A família PR-2 é formada pela enzima β-1,3-glucanases que catalisam a clivagem hidrolítica de ligações do tipo endo β-1,3-D-glucosídicas de β-1,3-D-glucanas da parede de patógenos. A atuação da β-1,3 glucanase na defesa vegetal ocorre por meio do uso de indutores de resistência, os quais visam proteger não apenas a planta, mas também seus produtos como frutas, verduras e grãos, entre outros, em pré e pós-colheita (Bertoldo; Mazaro, 2018).

Phytophthora é um oomiceto que apresenta na constituição da parede celular β-glucanas e celulose (Luz & Matsuoka; Schroeder et al., 2013). As β-1,3-glucanas atuam como moduladoras do sistema de defesa de plantas, conseguindo clivar a glucana, outro componente da parede celular de fungos e oomicetos. Agindo diretamente sobre o patógeno, estas proteínas causam lise da hifa e inibição do crescimento de fungos patogênicos. A atividade indireta dessas proteínas também pode ser obtida por meio da liberação de oligômeros de glucana e quitina, que são eficientes eliciadores de respostas de defesa de plantas (Campos, 2000).

Como resultado do acúmulo de PR-2 nas amostras de casca de cacau avaliadas, foi observada uma maior abundância nos genótipos FB 206 (susceptível) e TSH 1188 (mediamente resistente), enquanto no clone CCN 51 (resistente), o acúmulo de β-1,3 glucanases (PR-2) foi menor em comparação com os outros clones com características de susceptibilidade. Além disso, o maior acúmulo da enzima β-1,3 glucanase ocorreu sempre às 96 horas após a inoculação, uma vez que a atividade dessas enzimas é aumentada quando as plantas são tratadas com indutores de resistência ou como eliciadores de respostas de defesa (Schweizer et al., 2000). O aumento gradual dessas enzimas e a restrição de patógenos, tanto em plantas tratadas com elicitores quanto em plantas modificadas geneticamente, sugerem que as proteínas PR desempenham um papel importante na contenção de infecções (Labanca, 2002). (Figura 9).

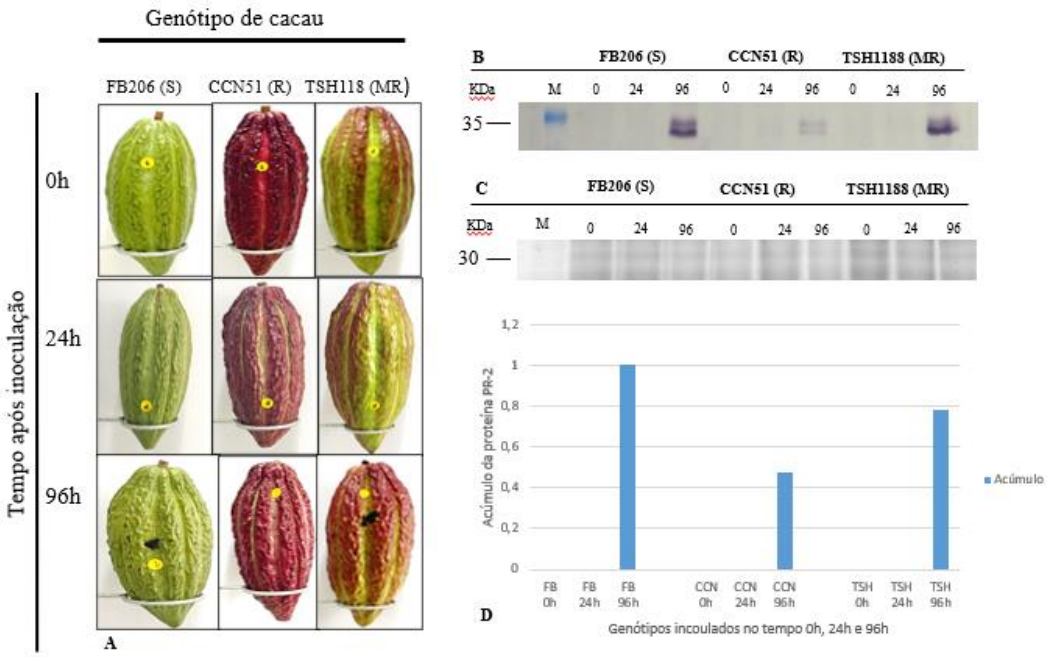

Figura 9:A: Painel dos genótipos de cacau inoculado nos tempos 0h (controle), 24h (após inoculado) e 96h (após inoculados) com *P. theobromicola*. **B:**Western blot dos genótipos inoculados nos tempos para a proteína PR-2. **C:** Gel espelho. **D:** Gráfico de acúmulo da proteína PR-2, determinado a partir de imagens da membrana de nitrocelulose, utilizando o Gel Quant. Software líquido 1.8.0.

4. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram diferenças nas características de susceptibilidade e resistência dos genótipos avaliados, evidenciadas pela maior indução de proteínas de defesa e resposta imune no genótipo resistente (CCN 51). Além disso, observou-se variação no acúmulo de proteínas de defesa ao longo do tempo de inoculação, revelando a dinâmica da resposta de defesa da planta à invasão do patógeno. Esses achados contribuem para uma melhor compreensão da interação entre o cacaueiro e o oomiceto *Phytophthora theobromicola*, fornecendo insights sobre os mecanismos moleculares envolvidos na defesa da planta. Ademais, a identificação de marcadores moleculares associados à resistência pode ter implicações significativas no melhoramento genético do cacaueiro, permitindo a seleção de genótipos mais resistentes à podridão-parda.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo contribuiu para o mapeamento de genes candidatos associados à resistência genética à podridão-parda, bem como para a identificação de potenciais genótipos com característica de resistência, que poderão ser alvo de estudos mais precisos no programa de melhoramento genético do cacaueiro. Além disso, a análise molecular permitiu corroborar de forma significativa, identificando proteínas envolvidas na defesa vegetal e observando seu acúmulo em diferentes genótipos. Esses resultados complementam de forma significativa os esforços de pesquisa no melhoramento genético do cacaueiro, visando reduzir as perdas causadas por doenças e desenvolver clones mais resistentes e produtivos.

6. Referências

Alcântara, G. C**aracterização funcional do gene soy BiP em resposta a estresses bióticos.** [s.l.] Universidade Estadual de Santa Cruz , 2020.
Andersson, U., Heddad, M., and Adamska, I. (2009). Light stress-induced one-helix protein of the chlorophyll a/b-binding family associated with photosystem I. **Plant physiology** 132, 811-820.

Anjum, N. A.; Sharma, P.; Gill, S. S. et al. Catalase and ascorbate peroxidase representative H2O2-detoxifying heme enzymes in plants. **Environ Sci Pollut**Res v. 23, p. 19002-29, 2016.

Bertoldo, E.; Mazaro, S. M. β-1,3 Glucanases: uma revisão sob a ótica da defesa vegetal.**Scientia Agraria Paranaensis**, p. 1–13, 14 jun. 2018.

Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D (2000) Interação dinâmica de transdutores de estresse BiP e ER na resposta de proteína desdobrada. **Nat CellBiol** 2:326–332

Bonfim, P. et al. **Protein Level Defense Responses of Theobroma cacao Interaction With Phytophthora palmivora**. Frontiers in agronomy, v. 4, 10 fev. 2022.

Campos, M. A.; Monte, D. C.; Grossi de AS, M. F. **Mecanismos de moleculares de responsáveis pela resistência em interações planta-patógeno do tipo gene a gene.** Universa, Brasília, v.8, n.1, p.275-304, 2000.humanos, Antioxidantes e sinalização redox, 2008, vol**.** 10 (pág. 1527-1547).

Dias Game, P. et al. plantas de pimentãosubemtidas à injuria mecânicamodificam a expressão de proteínasemplantasvizinhasnãoinjuriadas**Revista Brasileira de AgropecuáriaSustentável**, n. 1, p. 2013, [s.d.].

Jing, M. et al. A *Phytophthora sojae* effector suppresses endoplasmic reticulum stress-mediated immunity by stabilizing plant Binding immunoglobulin Proteins. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 11685, 3 jun. 2016.

Kopp MC, Larburu N, Durairaj V, Adams CJ, Ali MMU. **UPR proteins IRE1 and PERK switch BiP from chaperone to ER stress sensor.** Nat Struct Mol Biol. 2019 Nov;26(11):1053-1062. doi: 10.1038/s41594-019-0324-9. Epub 2019 Nov 6. PMID: 31695187; PMCID: PMC6858872.

Labanca, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em Saccharomyces cerevisiae: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumissativus*) contra *colletotrichumlagenarium*e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine Max*)**. 2002. 118 p. Dissertação de (Mestrado)

Lennon, A. M. et al. Photochemical responses to light in sun and shade leaves of Theobroma cacao L. (West African Amelonado). **Scientia horticulturae**, v. 276, n. 109747, p. 109747, 2021.

Liu TL, Ye WW, Ru YY, Yang XY, Gu B, Tao K, Lu S, Dong SM, Zheng XB, ShanWX Wang YC, Dou DL (2011) Dois efetores citoplasmáticos do hospedeiro são necessários para a patogênese de *Phytophthora sojae* pela supressão de defesas do hospedeiro. Fisiol Vegetal 155:490–501

Liu, H. et al. Genomes and virulence difference between two physiological races of *Phytophthora nicotianae*. **GigaScience**, v. 5, n. 1, 28 jan. 2016.

Mclllan H, Boevink PC, Armstrong MR, Pritchard L, Gomez S, Morales J, Whisson SC, Beynon JL, Birch PRJ (2013) **Um efetor RxLR de Phytophthora infestans evita a relocalização de dois fatores de transcrição NAC de plantas do retículo endoplasmático para O núcleo.** PLoS Pathog 9:e1003670

Mhamdi, A. et al. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4197–4220, 27 set. 2010.

Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405–410, set. 2002. **Moodle USP: e-Disciplinas.** Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4127298/mod_resource/content/0/Teorica%2002%20-%20Mec%20R%20Estruturais%20Bioq%20Posformados%20IR%202017%20b.pdf>. Acesso em: 3 abr. 2024.

OOMICETOS: CARACTERÍSTICAS, CICLO DE VIDA, NUTRIÇÃO, REPRODUÇÃO - BIOLOGIA - 2024. Disponível em: <https://sperohope.com/oomicetos-caracter-sticas#menu-8>. Acesso em: 1 abr. 2024. Queiroz’’, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

Raiput NA, Zhang M, Ru Y, Liu T, Xu J, Liu L, Mafurah JJ, Dou D (2014) O **efetor PsCRN70 de *Phytophthora sojae* suprime as defesas das plantas em Nicotianabenthamiana**. PLoS Um 9:e98114

Saijo Y (2010) **Controle de qualidade ER de receptores e reguladores imunológicos em plantas.**Microbiol Celular 12:716–724

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS MORGANA ISADORA GOMES ABREU PROSPECÇÃO DE GENES PR-5 EM FRUTEIRAS NATIVAS OU ADAPTADAS AO SEMIÁRIDO PARAIBANO CUITÉ-PB 2016. [s.l: s.n.]. Disponível em <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/xmlui/bitstream/handle/riufcg/8011/MORGANA%20ISADORA%20GOMES%20ABREU%20-%20TCC%20LICENCIATURA%20EM%20CI%c3%8aNCIAS%20BIOL%c3%93GICAS%20CES%20%202016.pdf?sequence=3&isAllowed=y>. Acesso em: 3 abr. 2024.

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

Wang, W.; JIAO FANGCHAN. **Effectors of Phytophthora pathogens are powerful weapons for manipulating host immunity.** Planta, v. 250, n. 2, p. 413–425, 26 jun. 2019.

Yoshida, M.; MUNEYUKI, E.; HISABORI, T. ATP synthase – a marvellous rotary engine of the cell. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.2, p.669-677, 2001.

Zamoky M, Furtmüller PG, Obinger C. **Evolução das catalases de bactérias para**
Zhang MX, Li Q, Liu TL, Liu L, Shen DY, Zhu Y, Liu PH, Zhou JM, Dou DL (2015) **Dois efetores citoplasmáticos de *Phytophthora sojae* regulam a morte de células vegetais por meio de interações com catalases vegetais.**Fisiol Vegetal 167:164–175

Zhang, D., and Motilal, L. (2016). **"Origin, dispersal, and current global distribution of cacao genetic diversity," in Cacao Diseases** (Cham: Springer International Publishing), 3–31. doi: 10.1007/978-3-319-24789-2_1