

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

CELSO GASPAR LITHOLDO JUNIOR

**Identificação e expressão de genes da biossíntese do jasmonato na interação
entre *Theobroma cacao* e *Moniliophthora perniciosa***

**Piracicaba
2009**

CELSO GASPAR LITHOLDO JUNIOR

**Identificação e expressão de genes da biossíntese do jasmonato na interação
entre *Theobroma cacao* e *Moniliophthora perniciosa***

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear
na Agricultura da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia na Agricultura e no
Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira
Figueira

Piracicaba
2009

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Litholdo Junior, Celso Gaspar

Identificação e expressão de genes da biossíntese do jasmonato na interação entre *Theobroma cacao* e *Moniliophthora perniciosa* / Celso Gaspar Litholdo Junior; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Piracicaba, 2009.

89 p.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Expressão gênica 2. Hormônios vegetais 3. Interação planta-patógeno
4. Vassoura-de-bruxa I. Título

CDU 577.175.1:632.27

A minha querida família

A meu pai amigo Celso e minha mãe amiga Shirley, sempre me apoiando e batalhando pela realização dos meus sonhos....

DEDICO

A minha querida maninha Mariana,

A quem tenho a responsabilidade de ser um grande exemplo e apesar da distância em momentos importantes nos tornamos grandes amigos...

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Vida, maravilhosa, apaixonante e indecifrável.

Ao Prof. Dr. Antonio Figueira pela oportunidade concedida, e pelas contribuições e apoio ao meu desenvolvimento acadêmico e científico.

A minha querida companheira e namorada Fabiana Zocoller, pela paciência e atenção que tem me acompanhado, sempre incentivando com alegria e carinho incondicionais.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela possibilidade de realização do curso de mestrado, e aos relativos professores.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão de bolsa de estudo e apoio financeiro para realização desta pesquisa.

Ao Dr. Paulo Albuquerque e a Estação de Recursos Genéticos José Haroldo (ERJOH) pertencente à Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) por colocar a disposição a área experimental e o laboratório.

Ao Dr. Gildemberg Leal Jr., ou melhor, amigo Jupará, pela enorme força e atenção despendida durante todos os momentos da realização deste trabalho, além das inúmeras conversas e discussões científicas que proporcionaram aprendizado.

Aos integrantes do Laboratório de Melhoramento de Plantas: Aline, Ângela, Danielle, Deborah, Eduardo Bressan, Felipe, Gabriela, João, Laura, Layanne, Lígia, Lorena, Mariana, Matheus, Paula, Renato, Tais, Thaísa pelos momentos de convivência e aprendizado mútuo.

Especialmente agradeço aos amigos Francisco Claudio Lopes, João Felipe Nebó e Onildo Nunes pela grande amizade e pelos inúmeros momentos divertidos compartilhados sempre com responsabilidade.

Aos funcionários do Laboratório de Melhoramento de Plantas: Luis Eduardo Fonseca, Raquel Orsi e Wlamir Godoy pelo auxílio imprescindível e constante dentro do laboratório.

A Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli, às secretárias da Comissão de Pós-Graduação do CENA/USP: Cláudia Corrêa, Neuda Fernandes e Sônia Barros, aos funcionários da biblioteca Celsinho, Marília Henyei, Raquel Carvalho e Renata Mazzero pela boa disposição em ajudar sempre.

Aos meus amigos Cássio Tuba, Gabriel Sapão e Henrique Tamagushi pela convivência harmoniosa e tranqüila, e a República Biosfera pela acolhida nos momentos de necessidade.

Aos inesquecíveis amigos de longa data, que apesar de distantes fisicamente, temos a impressão de estarmos em constante sintonia: Carol Cainelli, Cacá Diegues Cainelli, Ciniro Jr., Daiane Loira, Daniel Track, Dom Diogo, Ivo Salvador, Luis Gustavo Tarta, Marcelo Buda e Súlito.

Ao meu avô Geraldo, minhas avós Clarisse e Lina, a minha madrinha Márcia, minhas primas Marcela e Luana, meu tio Ricardo, meu tio Cesar e tia Virgínia e todos os primos, tios e tias que formam minha família e sempre torcem por mim.

Aos meus pais Celso e Shirley por investirem desde pequeno na minha educação e sempre me darem a liberdade de buscar os meus objetivos, sempre me orientando na direção correta, e a minha querida irmã Mariana, que também agora esta seguindo seu caminho de realizações.

"Todo ser é
completo por
si."

Leonardo Boff

RESUMO

LITHOLDO JUNIOR, C. G. Identificação e expressão de genes da biossíntese do jasmonato na interação entre *Theobroma cacao* e *Moniliophthora perniciosa*. 2009. 89 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

A doença vassoura-de-bruxa do cacau (*Theobroma cacao* L.), causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* consiste numa importante enfermidade e apenas o uso de variedades resistentes representa uma solução econômica e ambientalmente viável. Os hormônios vegetais são imprescindíveis na rede de sinalização envolvida na resposta contra uma grande variedade de estresses bióticos e abióticos, sendo bem reconhecido o papel crucial do ácido salicílico (AS), etileno (ET) e os jasmonatos (JA) na interação planta-patógeno. O mecanismo de resistência observado em *T. cacao* contra o fungo hemibiotrófico *M. perniciosa* parece não envolver resposta de hipersensibilidade mediada pela sinalização por AS, e caracteriza-se pela menor incidência de sintomas e atenuação do crescimento micelial no material resistente. A resposta regulada por JA e/ou ET é determinada pela contenção e redução da colonização de tecidos infectados pelo patógeno, com atenuação dos sintomas manifestados, e está associada com a indução e produção de inibidores de protease, enzimas líticas da parede de fungos e enzimas do metabolismo secundário e cujo os genes demonstraram indução diferencial em amostras inoculadas com *M. perniciosa*. Recentemente, foi demonstrada a produção de AS pelo fungo *M. perniciosa*, o que poderia estar associado a um desarranjo hormonal na planta, auxiliando o patógeno no processo infectivo. A partir destas evidências este trabalho teve como hipótese que JA e/ou ET estaria regulando a interação *T. cacao* e *M. perniciosa*. Sabe-se que a transcrição de genes codificantes das enzimas da via de biossíntese de JA é induzida por aplicação exógena de metil-jasmonato (MJ) e por patógenos, assim para verificar a participação de JA na resposta de defesa de cacau, seqüências de genes que codificam para enzimas da via de biossíntese foram identificadas, classificadas e confirmados sua identidade por seqüenciamento. A indução e expressão quantitativa destes, além dos genes *Samsi*, *Accox*, *Pal*, *Jaz* e *Della*, foram avaliadas entre o acesso susceptível à *M. perniciosa* ('P7') e o resistente ('CAB 214') de *T. cacao*, em experimentos de aplicação de indutores (AS, ET e MJ) e inoculação com *M. perniciosa*. As análises de expressão gênica relativa por RT-qPCR foram conduzidas e a resposta dos genes de biossíntese de JA, quando tratado com MJ no 'P7' pareceu ser mais intensa e mais específica, enquanto que o acesso 'CAB 214' apresentou resposta com menor intensidade, porém com resposta mais precoce, demonstrando que o mecanismo de regulação positiva pela aplicação exógena de MJ também ocorre em *T. cacao*. Em relação à inoculação, os resultados de expressão gênica sugerem uma diferença na resposta transcricional dos genes analisados sob inoculação de *M. perniciosa* entre o 'P7' e o 'CAB 214' onde os transcritos de *Aos*, *Kat*, *Samsi* e *Jaz* apresentaram elevação significativa somente no 'CAB 214' em comparação ao 'P7'. Em acessos resistentes, como 'CAB 214', o efeito de AS produzido pelo fungo poderia não estar surtindo efeitos antagônicos, como indicado pelo aumento transcricional de *Aos*, gene codificador da principal enzima envolvida na biossíntese de JA, e embora os demais genes da via estejam sendo reprimidos, muito possivelmente a sinalização da resposta de defesa do acesso resistente 'CAB 214' seja desencadeada por JA, devido ao papel central de AOS na sua biossíntese, e de maneira sinérgica ET estaria participando do mecanismo de resposta, indicado pela alta indução de *Samsi* no acesso resistente.

Palavras-chave: Hormônios vegetais, interação planta-patógeno, vassoura-de-bruxa

ABSTRACT

LITHOLDO JUNIOR, C. G. Identification and expression of genes associated with jasmonate biosynthesis in the *Theobroma cacao* and *Moniliophthora perniciosa* interaction. 2009. 89 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

Witches' broom disease of cacao (*Theobroma cacao* L.), caused by the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa* is an important disease and the use of resistant varieties is the only economic and environmental long-term solution. Plant hormones are essential in the signaling network involved in the response against a variety of biotic and abiotic stresses. It is well recognized the crucial role of salicylic acid (SA), ethylene (ET) and jasmonate (JA) in plant-pathogen interactions. The mechanism of resistance observed in *Theobroma cacao* against *M. perniciosa* does not appear to involve hypersensitivity response mediated by AS signaling, and it is characterized by lower incidence of symptoms and reduction of mycelial growth in resistant material. The response regulated by JA and/or ET is determined by the growth inhibition and a reduction of the colonization of infected tissues by the pathogen, together with an attenuation of symptoms. It is also associated with an induction and production of the protease inhibitors, lytic enzymes and enzymes of secondary metabolism and the genes encoding these enzymes have shown differential expression patterns in samples inoculated with *M. perniciosa*. It has been recently demonstrated that the production of AS by the fungus *M. perniciosa* could be associated with a hormonal disorder in the plant, which could therefore help the pathogen in the infective process. Considering this, the hypothesis that JA and/or ET would regulate the interaction of *T. cacao* with *M. perniciosa* was formulated in order to be tested by this research work. It is known that the transcription of genes encoding the enzymes of the JA biosynthesis pathway is induced by exogenous application of methyl jasmonate (MJ) and by pathogen, thus, in order to verify the involvement of JA in defense response of cocoa, sequences of genes that encode the enzymes of the JA biosynthesis pathway were isolated, identified, classified and had their identity confirmed by sequencing, and relative quantitative gene expression were evaluated in susceptible 'P7' and resistant 'CAB 214' plants of *T. cacao*. In addition genes *Sams*, *Accox*, *Pal*, *Jaz* and *Della*, were evaluated in experiments with application of inducers (AS, ET and MJ) and inoculation with *M. perniciosa*. Analysis of relative gene expression by RT-qPCR were conducted and 'P7' seems to have the expression of jasmonate biosynthesis genes in a more intense and more specific manner when treated with MJ, while 'CAB 214' shows an earlier yet lower response suggesting that the mechanism of positive regulation by the exogenous application of MJ also occurs in *T. cacao*. For the inoculation, the gene expression results suggest a difference in the transcriptional response from inoculation with *M. perniciosa* between 'P7' and 'CAB 214' in *T. cacao*. The effect of AS produced by the fungus may not have antagonistic effects in resistant materials such as 'CAB 214', as indicated by the increase of the transcription of *Aos* gene that encodes the main enzyme involved in JA biosynthesis, so the defense responses of 'CAB 214' is possibly triggered by JA signaling, because the central role of AOS in its biosynthesis, and may be part of synergistic ET signaling, indicated by high *Samsi* expression in resistance material.

Keywords: Plant hormones, plant-pathogen interaction, witches' broom disease

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Interação Planta-Patógeno	13
2.2 <i>Theobroma cacao</i> e a vassoura-de-bruxa	17
2.3 Mecanismo de resistência em <i>T. cacao</i> contra <i>M. perniciosa</i>	20
2.4 Jasmonatos	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Material vegetal e ensaios	25
3.1.1 Tratamento com indutores de resistência	25
3.1.2 Produção de basidiósporos e inoculação	26
3.2 Identificação dos genes de biossíntese de jasmonato e demais genes de interesse.....	26
3.2.1 Classificação dos genes de biossíntese de jasmonato por análise filogenética.....	27
3.2.3 Desenho de oligonucleotídeos específicos	27
3.2.4 Desenho de oligonucleotídeos degenerados para os genes <i>Lox3</i> e <i>Aos</i>	29
3.3 Extração de RNA total e quantificação	29
3.3.1 Tratamento com DNase e síntese de cDNA	30
3.4 PCR e análise em gel de agarose.....	30
3.4.1 Purificação dos fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos	31
3.4.2 Clonagem dos fragmentos	32
3.4.3 Transformação por eletroporação e seleção dos transformantes	32
3.4.4 Extração de DNA plasmidial (Mini-preparação).....	33
3.4.5 Confirmação de presença de insertos por PCR e digestão enzimática.....	33
3.4.6 Seqüenciamento	34

3.5	Determinação da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR).....	35
3.5.1	Detecção de transcritos de <i>M. pernicioso</i>	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	Identificação dos genes de biossíntese de jasmonato e demais genes de interesse.....	37
4.1.2	Classificação dos genes de biossíntese de jasmonato por análise filogenética.....	40
4.2	Amplificações a partir dos oligonucleotídeos específicos.....	46
4.2.1	Desenho e amplificação a partir dos oligonucleotídeos degenerados.....	47
4.2.2	Clonagem, seqüenciamento e identificação dos genes clonados.....	50
4.3	Análise da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) em amostras tratadas com indutores ácido salicílico, ethefon e metil-jasmonato.....	54
4.4	Detecção de <i>M. pernicioso</i> por transcritos reversos em amostras de ‘P7’ e ‘CAB 214’.....	64
4.4.1	Análise da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) em amostras inoculadas com <i>M. pernicioso</i>	66
4.5	Quantificação de <i>M. pernicioso</i> por transcritos reversos em amostras de ‘P7’ e ‘CAB 214’.....	71
5	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICE A	87
	APÊNDICE B	88
	APÊNDICE C	89

1 INTRODUÇÃO

A vassoura-de-bruxa do cacauero (*Theobroma cacao* L.), causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* consiste numa importante enfermidade do cacauero, restrita a América do Sul e Caribe, sendo a doença endêmica da região Amazônica (PURDY; SCHIMDT, 1996). Sua introdução em regiões produtoras de cacau provocou o colapso das lavouras no Suriname, Trinidad, Equador (ANDEBRHAN; ALMEIDA; NAKAIAMA, 1999) e no sul da Bahia (PEREIRA et al., 1989). Os métodos de controle da vassoura-de-bruxa do cacauero incluem o manejo e poda fitossanitária (remoção das partes infectadas); controle químico e biológico, mas apenas o uso de variedades resistentes representa uma solução econômica e ambientalmente viável (PURDY; SCHIMDT, 1996).

O fungo *M. perniciosa* é um patógeno hemibiotrófico, que exibe um tipo de micélio em cada fase do ciclo de vida (PURDY; SCHIMDT, 1996). Os basidiósporos são produzidos nos basidiocarpos, e consistem na única estrutura infectiva. Os basidiósporos depositados na planta, após a germinação, infectam tecidos meristemáticos do cacauero (ramos, almofadas florais, flores e frutos em desenvolvimento) induzindo uma série de sintomas (PURDY; SCHIMDT, 1996). O crescimento hipertrófico de gemas infectadas, causando as vassouras, consiste no sintoma mais característico da doença. A infecção de almofadas florais leva ao surgimento de lançamentos vegetativos, à produção de flores anormais e frutos paternocárpicos. As infecções nos frutos em desenvolvimento causam a perda direta de sementes, sendo que a produção de frutos também é afetada indiretamente pela infecção de flores e pela redução da área fotossintética devido à morte dos ramos doentes. O ciclo do patógeno completa-se com a produção de basidiocarpos em vassouras necrosadas e frutos secos, reiniciando com a liberação de basidiósporos na atmosfera (PURDY; SCHIMDT, 1996).

Os hormônios vegetais possuem um importante papel na regulação do desenvolvimento da planta e na rede de sinalização envolvida na resposta contra uma grande variedade de estresses bióticos e abióticos, sendo bem reconhecido o papel crucial do ácido salicílico (AS), etileno (ET) e os jasmonatos (JA) na interação planta-patógeno (ROBERTSEILANANTZ et al., 2007). De um modo simplificado, o AS estaria associado a resistência à patógenos biotróficos e hemibiotróficos, desencadeando uma resposta de hipersensibilidade (HR) e privando o patógeno de nutrientes para o seu desenvolvimento, enquanto que o ET e JA estariam participando na resposta contra patógenos necrotróficos (BARI; JONES, 2009).

Estas duas vias de sinalização, na maioria dos casos, atuam de forma antagônica, ou seja, quando uma das vias é recrutada para a resposta de defesa, a outra via conseqüentemente é reprimida.

O mecanismo de resistência observado em *T. cacao* contra *M. pernicioso* parece não envolver resposta HR, mediada por AS e caracteriza-se pela menor incidência de sintomas e atenuação do crescimento micelial no genótipo resistente (FRIAS; PURDY; SCHMIDT, 1991; SILVA; LUZ; MATSUOKA, et al., 1999; LEAL JUNIOR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007). A resposta regulada pelo jasmonato e/ou etileno é determinada pela contenção e redução da colonização de tecidos infectados pelo patógeno, com atenuação dos sintomas manifestados da doença (VIJAYAN et al., 1998; FEYS; PARKER, 2000). A forma de resistência manifestada no cacau em resposta à infecção, junto com os dados dos genes identificados em bibliotecas de interação e a expressão gênica sugerem que o mecanismo de resistência contra *M. pernicioso* estaria sendo regulado pelos hormônios ácido jasmônico e/ou etileno. A associação do jasmonato com o aumento da atividade proteossômica regulada por ubiquitina (LORENZO; SOLANO, 2005), na atuação na resposta de defesa a fungos hemibiotróficos (POZO; VAN LOON; PIETERSE, 2005), e no estabelecimento de interações compatíveis (ISHIGA et al., 2002; 2003; HAUSE et al., 2007) indicam que provavelmente o jasmonato estaria regulando a interação incompatível entre *T. cacao* e *M. pernicioso*.

Curiosamente, o ácido jasmônico (JA) foi obtido primeiramente e identificado em um filtrado de cultura do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, patógeno secundário de *T. cacao*, descrito inicialmente como um inibidor de crescimento (ALDRIDGE et al., 1971). Os derivados do ácido jasmônico são denominados de jasmonatos, e são hormônios vegetais que atuam no desenvolvimento da planta e na regulação da resposta a estresses bióticos e abióticos (CREELMAN; MULLET, 1997). A elevação dos níveis de ácido jasmônico é correlacionado com a ativação transcricional de genes que codificam as enzimas da sua própria biossíntese (WASTERACK; HAUSE, 2002), podendo servir como indicador do nível elevado de JA (MAUCHER et al., 2000; STENZEL et al., 2003a).

O objetivo deste estudo foi identificar seqüências dos genes codificadores das enzimas da rota de biossíntese de JA em bancos de dados de EST de *T. cacao*, verificando o padrão de expressão quantitativa dos genes identificados em resposta à aplicação de ácido salicílico, ethefon e metil-jasmonato, e durante a interação entre *T. cacao* e *M. pernicioso*, sempre avaliando material resistente e susceptível à doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Interação Planta-Patógeno

As plantas constituem um excelente ecossistema para microrganismos por proporcionarem uma ampla variedade de habitats, incluindo a parte aérea (filosfera), o sistema radicular (rizosfera) e o sistema de transporte vascular interno (endosfera) (MONTESINOS, 2003). Atualmente 120 gêneros de fungos, 30 tipos de viroses e 8 gêneros de bactérias são responsáveis por cerca de 11 mil doenças conhecidas em plantas (MONTESINOS et al., 2002), e para o desenvolvimento destas doenças é necessário uma coincidência de fatores, como a susceptibilidade do hospedeiro, a virulência do patógeno e condições ambientais favoráveis (FERREIRA; MONTEIRO, 2006). As plantas são capazes de se protegerem contra a maioria dos microrganismos e a doença é particularmente uma exceção à regra (BARI; JONES, 2009).

Ao contrário do que acontece nos animais, onde células especializadas circulam e percebem a presença de antígenos, as células vegetais possuem uma resposta de defesa autônoma, com o reconhecimento e a resposta ocorrendo em cada única célula (FERREIRA; MONTEIRO, 2006). Entretanto, a ativação da defesa pela planta envolve uma complexa rede de sinais hormonais e uma extensiva amplificação dos sinais e *cross-talk* (“linha cruzada”) entre estes (SUZUKI et al., 2004).

A resistência hospedeiro-específica (*host resistance*) é a resistência cultivar- ou genótipo-específica quando, baseado na teoria gene a gene descrita em 1955 por H. H. Flor, ocorre o reconhecimento do produto dos genes *avr* (*avirulence*) do patógeno pelas proteínas oriundas dos genes *R* (*resistance*) da planta hospedeira. Neste caso, é dito que ocorre uma interação incompatível, o produto R e Avr são complementares, tornando-se o patógeno avirulento e a planta resistente à doença, geralmente desencadeando uma resposta de hipersensibilidade (HR), mediada por ácido salicílico (AS), com o suicídio das células rapidamente e espacialmente confinado ao sítio da infecção (FERREIRA; MONTEIRO, 2006). No caso em que a doença se desenvolve ocorre uma interação dita compatível, com a ausência ou não funcionalidade da proteína R, a qual não reconhece o produto do gene *avr*, tornando-se o patógeno virulento (GACHOMO; SHONUKAN; KOTCHONI, 2003).

Desta forma, não significa que todos os patógenos possam causar doenças em

quaisquer plantas, assim como uma determinada planta seja susceptível a todos fitopatógenos. Durante milhões de anos de associação entre plantas e microrganismos, surgiram mecanismos elaborados de defesa e patogenicidade nos organismos, respectivamente, levando a um grande jogo evolucionário de *ping-pong* entre as partes envolvidas (KEEN, 1999). A hipótese corrente do sistema imune de plantas é baseada no modelo *zig-zag* descrito por Jones e Dangl (2006). No primeiro momento, receptores transmembrana PRRs (*Pattern recognition receptors*) reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs – *Pathogen-associated molecular patterns*) desencadeando a imunidade nata inicial. Os patógenos aptos a burlarem esta primeira tentativa de defesa produzem efetores, que em um segundo momento vão diminuir a amplitude de defesa da planta (JONES; DANGL, 2006). A reação do hospedeiro poderá ser elevada numa terceira fase, em uma amplitude maior que a primeira, com a tradução dos genes *R* em proteínas do tipo NB-LRR que reconhecem, direta ou indiretamente, os efetores do patógeno, desencadeando a resposta HR. Eventualmente por seleção natural, os patógenos modificam ou adquirem novos efetores, os quais não serão mais reconhecidos pelas proteínas *R*, tornando-se a planta novamente susceptível na fase quatro, e novamente por seleção natural na fase cinco, as plantas tornam-se resistentes pelo reconhecimento dos efetores por novas proteínas *R* (JONES; DANGL, 2006).

Os fitopatógenos são divididos em biotróficos e necrotróficos, de acordo com o modo de obtenção de nutrientes. Patógenos biotróficos vivem e obtêm nutrientes de tecidos vivos, enquanto que os necrotróficos matam e se alimentam de tecido morto (AGRIOS, 1997). Alguns patógenos possuem as duas formas de nutrição em estágios diferentes de infecção e são ditos hemibiotróficos. A resistência mediada pelos genes *R* é associada com a ativação da via de sinalização dependente de ácido salicílico (AS) que leva a expressão de proteínas relacionadas à patogênese (*Pathogenesis-related* - PR) e desencadeia a resposta HR e está relacionada principalmente à patógenos biotróficos. Ao contrário, os patógenos necrotróficos que se beneficiam da morte celular do hospedeiro, não são limitados pela resposta HR e resposta de defesa dependente de AS, e sim por um conjunto de respostas ativadas pela sinalização por ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) (GLAZEBROOK, 2005). Apesar de parecer uma explanação simples e elegante, testes têm revelado que apesar desta idéia ser geralmente verdadeira, a situação real parece ser muito mais complexa (GLAZEBROOK, 2005). Respostas de defesa dependente de JA, as quais não são associadas com morte celular, fornecem uma defesa alternativa contra necrotróficos (MCDOWELL; DANGL, 2000), e procedem através do aumento da biossíntese de JA em resposta ao ataque do patógeno e conseqüente aumento na expressão de genes efetores de defesa. Esta sinalização é também

importante no desenvolvimento da planta e nas respostas a injúria e herbivoria (HALITSCHKE; BALDWIN, 2004).

Os fitohormônios apresentam um papel importante na sinalização das respostas das plantas na interação com microrganismos. As plantas produzem uma grande variedade de hormônios que possuem papéis importantes no desenvolvimento e metabolismo, assim como nas respostas a estresses bióticos e abióticos. As infecções resultam em mudanças no nível dos fitormônios e os fitopatógenos têm desenvolvido mecanismos para manipular esta rede regulatória em seu benefício, produzindo hormônios ou compostos análogos de modo a burlar o sistema de defesa do hospedeiro e/ou facilitar a patogênese (BARI; JONES, 2009).

Embora as vias de defesa relacionadas a AS e JA/ET serem geralmente antagônicas, a interação é mediada por diferentes reguladores, como a proteína NPR1 (SPOEL; JOHNSON; DONG, 2007), o fator de transcrição WRKY70 (LI; BRADER; PALVA, 2004), a proteína quinase MPK4 (BRODERSEN et al., 2006), e a enzima glutaredoxin (NDAMUKONG et al., 2007). Evidências de interações sinérgicas entre AS e ET/JA também foram relatadas (MUR et al., 2006), sugerindo que a rede de sinalização de defesa ativada e utilizada pela planta é dependente da natureza do patógeno e do seu modo de patogenicidade; além disso o estilo de vida dos diferentes patógenos não permitem classificá-los claramente como biotróficos ou necrotróficos (BARI; JONES, 2009).

Uma das razões para o significado biológico da interação antagônica na sinalização de defesa entre AS e JA deriva de experimentos os quais sugerem que patógenos podem usar estes mecanismos de *cross-talk* para regular negativamente a defesa do hospedeiro (ROJO; SOLANO; SÁNCHEZ-SERRANO, 2003). É o caso da coronatina, que é estruturalmente análoga à JA, produzida pela bactéria hemibiotrófica *Pseudomonas syringae* (CUI et al., 2005), o que promove uma susceptibilidade sistêmica pela atenuação da sinalização por AS. Também no caso da giberelina (GA), produzida pelo fungo necrotrófico *Gibberella fujikuroi* que promove doença caracterizada pelo excesso de crescimento em arroz (*bakanae*). As proteínas DELLA são repressoras do crescimento de plantas, cuja degradação é promovida pelo hormônio GA (SUN; GLUBER, 2004). Foi demonstrado que as proteínas DELLA promovem resistência à necrotróficos, de certa forma alterando o balanço de sinalização entre AS e JA, sugerindo assim uma explicação biológica para a produção de GA pelo fungo (NAVARRO et al., 2008), o que estaria promovendo susceptibilidade à necrotróficos.

Recentemente, foi realizada a análise do genoma de *M. pernicioso* que revelou através de bioinformática, que uma porção significativa do genoma do fungo estaria envolvida na adaptação a estresses e necrose da planta, assim como se identificou genes relacionados à

biossíntese de fitormônios (MONDEGO et al., 2008), o que poderia estar associado ao desarranjo hormonal na planta, auxiliando o patógeno no processo infectivo (ROBERT-SEILANIATZ et al., 2007). Foi também demonstrada a produção de AS pelo fungo *M. pernicioso* (KILARU; BAILEY; HASENSTEIN, 2007; CHAVES; GIANFAGNA, 2006). Isolados de *M. pernicioso* coletados em tecidos doentes, produziram AS em meio de cultura e seguindo o modelo de interação entre AS e JA/ET na interação entre *T. cacao* e *M. pernicioso*, AS bloquearia a via de sinalização JA/ET, rendendo à planta susceptibilidade à infecção (CHAVES; GIANFAGNA, 2006). Existem especulações de que *M. pernicioso* se modificou de uma espécie endofítica para patogênica, assim é possível que isolados não patogênicos não produzam AS e, portanto desenvolvam uma interação simbiótica com *T. cacao*, e que o mecanismo de produção de AS teria surgido para alterar o sistema de defesa da planta, transformando *M. pernicioso* de um organismo biotrófico e endofítico para um organismo hemibiotrófico (CHAVES; GIANFAGNA, 2006).

A maioria dos estudos que relacionam as interações das vias dependente de JA e ET indicam que estas agem cooperativa e sinergicamente contra patógenos necrotróficos, mediada pela participação do fator de transcrição ERF1 (LORENZO et al., 2003), e também pelo fator de transcrição MYC2, embora MYC2 contribua para a expressão de genes somente em resposta à injúria e reprime genes em resposta à patógenos (KAZAN; MANNERS, 2008). Porém, a associação antagônica entre estes hormônios também já foi relatada em casos de morte celular induzida por ozônio (OVERMYER; BROSCHE; KANGASJÄRVI, 2003).

Inúmeras evidências têm demonstrado o envolvimento de múltiplos hormônios nas interações planta-patógeno, porém o mais importante é que o efeito de cada um dos hormônios parece seguir o modelo clássico do antagonismo entre AS e ET/JA (ROBERT-SEILANIATZ et al., 2007). Na maioria dos casos, auxina e citocinina promovem susceptibilidade à biotróficos, pela indução da via relacionada à ET/JA, e ambos são produzidos por patógenos biotróficos; o ácido abscísico (ABA), crucial em respostas à estresses abióticos, também tem sido implicado na susceptibilidade à patógenos biotróficos e necrotróficos, agindo principalmente como um regulador negativo das respostas de defesa da planta; porém, ABA pode agir como um sinal positivo de defesa contra alguns necrotróficos (TON; MAUCHI-MANI, 2004), promovendo acúmulo de JA e mediando o *cross-talk* entre as vias de sinalização por AS e JA (FAN et al., 2009); e por fim os brassinosteróides, que promovem resistência à biotróficos, porém de uma forma independente de AS.

Uma melhor compreensão das respostas de defesa das plantas mediada por estes inúmeros fitormônios é um passo importante no planejamento de estratégias efetivas para a

engenharia de culturas resistentes às doenças (ROBERT-SEILANIANZ et al., 2007).

2.2 *Theobroma cacao* e a vassoura-de-bruxa

Theobroma cacao é uma árvore nativa da floresta Amazônica, encontrada principalmente sob a copa das florestas da América do Sul e Central. As suas sementes representam a única fonte de matéria prima para a produção do chocolate e da manteiga de cacau, sendo cultivada desde a antiguidade pelos povos indígenas Maias e Astecas. A doença vassoura-de-bruxa, causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora (=Crinipellis) perniciosa* (Stahel) (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005), consiste numa importante enfermidade do cacauero, restrita a América do Sul e Caribe, que provoca perda de frutos e má formação de ramos e almofadas florais (PURDY; SCHMIDT, 1996). A Bahia foi umas das maiores áreas de produção de cacau antes da introdução da doença no estado em 1989 (PEREIRA et al., 1989), onde permanece hoje como o principal fator limitante à produção. A doença é endêmica da região Amazônica e a sua introdução provocou também o colapso das lavouras no Suriname, Trinidad e Equador (ANDEBRHAN, ALMEIDA, NAKAIAMA, 1999). Anualmente estima-se que as perdas geradas pela doença nos países produtores da América alcance cerca de 250 mil toneladas por ano (BOWERS et al., 2001), causando a queda na produção brasileira de 405 mil toneladas em 1986, para a previsão de 157 mil toneladas para a safra 2008/2009 (ICCO, 2009).

O fungo *M. perniciosa* é um patógeno hemibiotrófico, que exhibe um tipo de micélio em cada fase do ciclo de vida. Em tecidos infectados verdes, o micélio é largo (5 a 8 μm), biotrófico, sem grampos de conexão e com crescimento intercelular. Após a necrose do tecido infectado, o micélio típico torna-se mais fino (1,5 a 3 μm), com grampos de conexão e é encontrado inter-e intracelularmente (DELGADO; COOK, 1976; EVANS, 1978; 1980; GRIFFITH; HEDGER, 1994). Os basidiósporos são produzidos nos basidiocarpos, e consistem na única estrutura infectiva, germinando em tecidos jovens, como meristema apical e axilar, folhas jovens, almofadas florais e flores em desenvolvimento, induzindo uma série de sintomas (PURDY; SCHMIDT, 1996). O crescimento hipertrófico de gemas infectadas, causando as vassouras, consiste no sintoma mais característico da doença. A infecção de almofadas florais leva ao surgimento de lançamentos vegetativos, à produção de flores anormais e frutos paternocárpicos. As infecções nos frutos em desenvolvimento causam a

perda direta de sementes, sendo que a produção de frutos também é afetada indiretamente pela infecção de flores e pela redução da área fotossintética devido à morte dos ramos doentes. O ciclo do patógeno completa-se com a produção de basidiocarpos em vassouras necrosadas e frutos secos, reiniciando com a liberação de basidiósporos na atmosfera (PURDY; SCHMIDT, 1996).

Os métodos de controle da vassoura-de-bruxa do cacauero incluem o manejo e poda fitossanitária (remoção das partes infectadas); controle químico e biológico, principalmente através de fungos endofíticos (MEJÍA et al., 2008) ou saprofíticos, mas apenas o uso de variedades resistentes tem representado uma solução econômica e ambientalmente viável. O controle químico da vassoura-de-bruxa com fungicidas de contato não é eficiente, pois eles não protegem os tecidos em crescimento ativo, necessitando inúmeras pulverizações (PURDY; SCHMIDT, 1996). O manejo fitossanitário da vassoura-de-bruxa é realizado em todos os países afetados. As vassouras são removidas durante o período da seca com o objetivo de reduzir o inóculo produzido no período chuvoso, diminuindo a incidência da doença no próximo ciclo produtivo da cultura (PURDY; SCHMIDT, 1996). A poda fitossanitária tem sido no controle da vassoura-de-bruxa, junto com o controle genético, o manejo mais eficaz na maioria dos países produtores de cacau da Amazônia. O fator limitante da adoção da poda fitossanitária é o custo elevado com a mão-de-obra e a necessidade de ser realizada anualmente e no mínimo quatro vezes ao ano, dificultando a adoção por todos os produtores (ALBUQUERQUE; MOTA; ANDEBRHAN, 1995). O controle biológico fundamenta-se no uso de fungos saprofíticos (ex. *Trichoderma stromaticum*) que são competidores pela colonização das vassouras secas de modo a evitar o desenvolvimento de *M. perniciosa* e a produção de basidiocarpos (COSTA; BEZERRA; BASTOS, 1998; LAWRENCE; CAMPELO; FIGUEIREDO, 1991). Entretanto, esse método ainda não apresenta eficácia no controle de partes afetadas. A forma definitiva e mais eficiente de controle consiste no emprego de variedades resistentes.

O melhoramento do *T. cacao* para resistência a vassoura-de-bruxa iniciou-se no Equador a partir de 1918, pela seleção massal de plântulas originadas de árvores selecionadas sem sintomas (BARTLEY, 1986). Na busca da resistência, cacaueros silvestres foram coletados no vale Amazônico por via seminal em 1938, e por via clonal em 1942 (POUND, 1938). Dos materiais identificados nas buscas realizadas nos anos de 1938 e 1942, os clones 'Scavina 6' e 'Scavina 12' destacaram-se como altamente resistentes (BARTLEY, 1986). O 'Scavina 12' era considerado heterozigoto para resistência, enquanto 'Scavina 6' foi considerado homozigoto, mas devido a suas características agrônomicas inferiores,

principalmente o peso de sementes e auto-incompatibilidade, esses genótipos não foram utilizados diretamente como clones, mas empregados como genitores de combinações híbridas (BARTLEY, 1986). Scavina 6' e 'Scavina 12' tem sido ainda considerados resistentes em Trinidad (LAKER; SREENIVASAN; KUMAR, 1988; SURUJDEO-MAHARAJ et al., 2003), entretanto ambos têm demonstrado sintomas de infecção desde 1976 (BARTLEY, 1986) motivando a busca de novas fontes de resistência divergentes geneticamente do 'Scavina 6'. O Ministério da Agricultura e Pecuária Brasileiro, através da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), realizou buscas sistemáticas de acessos de germoplasma por mais de 30 anos na Amazônia brasileira, mantidos na Estação de Recursos Genéticos José Haroldo (ERJOH), localizada em Marituba, PA. Essa coleção foi avaliada para resistência à vassoura-de-bruxa e, entre as novas fontes identificadas, destacam-se os acessos 'CAB 214' e 'CAB 208' (ALBUQUERQUE, 2006; FONSECA; ALBUQUERQUE, 2000; LEAL JUNIOR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007; SILVA et al., 1998).

O caráter de resistência do 'Scavina 6' está associado a um loco principal de característica quantitativa (*Quantitative Trait Loci* - QTL) no grupo de ligação 9 responsável por explicar até 51% da variância fenotípica para resistência (QUEIRÓZ et al., 2003; BROWN et al., 2005). No acesso 'CAB 208' e 'CAB 214' foi possível identificar quatro grupos de ligação relacionados com a resistência à vassoura-de-bruxa: um presente no grupo de ligação 8 e outro no grupo de ligação 9 no 'CAB 208', e os outros dois no 'CAB 214', sendo um no grupo de ligação 4 e outro no grupo de ligação 9, este próximo ao identificado em 'Scavina 6' (ALBUQUERQUE, 2006; informação pessoal). Entretanto, o aumento na incidência de sintomas na copa entre 'Scavina 6' em relação ao 'CAB 214' e 'CAB 208' sugerem que o controle da resistência deriva de locos distintos. A resistência do 'Scavina 6' possui caráter dominante e predominantemente monogênica (BARTLEY, 1986; QUEIRÓZ et al., 2003; BROWN et al., 2005), mas não pode ser considerada como do tipo de resistência dominante e monogênica descrita por Flor (1971), que em regra, se manifesta contra patógenos biotróficos que desenvolvem estruturas específicas para nutrição, e se caracteriza pela morte celular localizada no ponto de infecção, denominadas de resposta de hipersensibilidade (HR), ativando a resposta imune sistêmica mediada pelo hormônio vegetal ácido salicílico (AS) (GLAZEBROOK, 2005). Nas avaliações de resistência de *T. cacao* a *M. perniciosa* não foi observada a resposta de hipersensibilidade mediada por AS tanto para o 'Scavina 6' e seus derivados, como para o 'CAB 214' e 'CAB 208'.

2.3 Mecanismo de resistência em *T. cacao* contra *M. pernicioso*

O mecanismo de resistência observado em *T. cacao* contra *M. pernicioso* caracteriza-se pela contenção do crescimento micelial no material resistente e na atenuação dos sintomas manifestados da doença (FRIAS; PURDY; SCHIMIDT, 1991; SILVA; LUZ; MATSUOKA, 1999; LEAL JUNIOR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007). Diferentes estudos histológicos de tecidos de plantas inoculadas de *T. cacao* por *M. pernicioso* revelam um crescimento abundante de micélio em materiais suscetíveis infectados, e uma correlação parcial entre menor colonização de tecidos e a resistência determinada pela menor incidência de doença (FRIAS; PURDY; SCHIMIDT, 1991; FONSECA, 1990; SILVA; LUZ; MATSUOKA, 1999). Característica semelhante de resistência foi observada nos acessos CAB 214 e CAB 208, nos quais a detecção de transcritos do fungo por RT-qPCR foi apenas possível nas primeiras horas após a inoculação (até 24 h para CAB 214 e até 72 h para CAB 208, enquanto no suscetível ICS 39 a detecção aconteceu até o período mais avançado após a inoculação, com 240 h (LEAL JUNIOR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007).

A resposta regulada por JA e/ou ET é determinada pela contenção e redução da colonização de tecidos infectados pelo patógeno, com atenuação dos sintomas manifestados (VIJAYAN et al., 1998; FEYS; PARKER, 2000), e está associada com a indução e produção de proteínas do tipo tionina, defensinas, osmotina, inibidores de proteinase, enzimas da síntese de fitoalexinas, líticas de parede celular e proteínas de reserva algumas com atividades antifúngicas, e outras ainda desconhecidas (DEVOTO; TURNER, 2005; LORENZO; SOLANO, 2005; XU et al., 1994). Em bibliotecas de interação com cacauzeiro, muitos desses genes que codificam para as proteínas citadas acima foram identificados, e estudos de expressão gênica têm mostrado especificidade de indução destes genes para a via do jasmonato (VERICA et al., 2004). Assim a resposta relatada para materiais resistente, como 'Scavina 6' e seus derivados, poderia estar sendo regulada pelos hormônios vegetais JA e/ou ET. Em bibliotecas de *T. cacao*, enriquecidos para genes expressos no fenótipo resistente, foi encontrado uma maior proporção de genes que codificam para proteínas inibidoras de protease, enzimas líticas de parede de fungo e enzimas do metabolismo secundário com ênfase para genes do metabolismo de flavonóides, e estes demonstraram indução diferencial em amostras inoculadas, através de análises por RT-qPCR (LEAL JUNIOR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007). Outra característica marcante da biblioteca foi a presença de genes que traduzem para o complexo de degradação de proteínas marcadas com

ubiquitina, uma característica associada à resposta regulada pelo jasmonato (LORENZO; SOLANO, 2005). O estudo da expressão gênica reforçou a associação entre a característica de resistências dos materiais CAB 208 e CAB 214 com a expressão de genes associados ao metabolismo secundário, principalmente síntese de taninos condensados, e enzimas líticas. O aumento da produção de taninos condensados nas primeiras 24 h da interação *T. cacao* e *M. perniciosa* já foram observados, assim como sua atividade antimicrobiana contra hifas biotróficas de *M. perniciosa* (BROWNLEE; HEDGER; SCOTT, 1992; SCARPARI et al., 2005). Sob infecção com *M. perniciosa*, um aumento na produção de ET previamente ao desenvolvimento dos sintomas na interação com *T. cacao* também já foi relatada, indicando participação na resposta do hospedeiro (SCARPARI et al., 2005). Além disso, a proteína NEP1 (*Necrosis and ethylene-inducing peptide*), que possui a habilidade de induzir a necrose em inúmeras plantas (BAILEY et al., 2005; VERICA et al., 2004), inclusive o cacau (GARCIA et al., 2007), foi encontrada no genoma de *M. perniciosa*, e foi sugerido de não estar associada em *Arabidopsis* com a via de sinalização por AS, e pelo contrário, ocorrer indução rapidamente dos genes envolvidos na biossíntese de JA, após a indução de raízes e cotilédones por NEP1 do fungo *Fusarium oxysporum* (BAE et al., 2006).

A forma de resistência manifestada no cacau em resposta à infecção, junto com os dados dos genes identificados nas bibliotecas de interação e a expressão gênica sugerem que o mecanismo de resistência contra *M. perniciosa* estaria sendo regulado pelo hormônio vegetal JA e/ou ET. A associação de JA no aumento da atividade proteossômica regulada por ubiquitina (LORENZO; SOLANO, 2005), na atuação na resposta de defesa a fungos hemibiotróficos (POZO; VAN LOON; PIETERSE, 2005) e no estabelecimento de interações compatíveis (ISHIGA et al., 2002; 2003; HAUSE et al., 2007) indicam que provavelmente o jasmonato estaria regulando a interação compatível e incompatível de *T. cacao* com *M. perniciosa*. Um melhor entendimento dos mecanismos genéticos e fisiológicos que dão bases ao desenvolvimento da doença é vital para proteger a produção mundial de cacau da vassoura-de-bruxa.

2.4 Jasmonatos

Os jasmonatos (JA) fazem parte de uma classe maior de moléculas sinalizadoras conhecidas como oxilipinas, que são moléculas derivadas da oxigenação de ácidos graxos

polinsaturados, encontradas na maioria dos organismos (KAZAN; MANNERS, 2008). As prostaglandinas derivadas do ácido araquidônico são o grupo mais bem estudado de oxilipinas, e encontrada nos animais participam de processos inflamatórios em resposta à estresses, infecção e alergia (STANLEY, 2006). Os jasmonatos são todas as moléculas derivadas do ácido jasmônico, que incluem metil-jasmonato, conjugados com aminoácidos, como jasmonoil-isoleucina, e com açúcares (WASTERACK, 2007), e são geralmente considerados análogos estruturais e funcionais às prostaglandinas dos animais.

JA modula a expressão de inúmeros genes, tanto a nível traducional quanto transcricional e também no processamento do RNA, influenciando aspectos específicos do crescimento, desenvolvimento e respostas a estresses bióticos e abióticos em plantas (CREELMAN; MULLET, 1997). O papel de JA é bem estabelecido como parte de uma complexa via de sinalização ativada por herbivoria (SCHILMILLER; HOWE, 2005) e interação de planta e microrganismos (POZO; VAN LOON; PIETERSE, 2005). Os níveis endógenos de JA aumentam após ferimentos ou ataques de patógenos, e é sucedido pela ativação de genes envolvidos em respostas de defesa, tais como inibidores de proteinase, enzimas de síntese de fitoalexinas (*Chalcone synthase* - CHS, *Phenylalanine ammonia lyase* - PAL), proteínas de armazenamento vegetativo (VSP), proteínas antifúngicas (tioninas, osmotinas e defensinas, como *Plant defensin* – PDF1.2) (DEVOTO; TURNER, 2005); e também tem se estabelecido o papel de JA em interações simbióticas, como na interação micorrízica arbuscular (HAUSE et al., 2007).

A elevação dos níveis de ácido jasmônico é geralmente correlacionada com a ativação de genes que codificam as enzimas da sua própria biossíntese (WASTERACK; HAUSE, 2002; MAUCHER et al., 2000; STENZEL et al., 2003a). A biossíntese de JA acontece inicialmente nos cloroplastos, com a oxigenação do ácido α -linolênico pela enzima *13-lipoxygenase* (LOX), gerando o composto ácido 13-hidroperoxi-linolênico, o qual é convertido, na primeira reação da via biossintética, ao ácido 12,13-epoxilinolênico pela *Allene Oxide Synthase* (AOS), enzima chave da via (HOWE et al., 2000). Subseqüentemente no citosol, o composto 12,13-epoxilinolênico é convertido ao ácido 12-oxofitodienóico (OPDA) pela ação da *Allene Oxide Cyclase* (AOC). No peroxissomo OPDA sofre uma redução por ação da enzima *OPDA reductase* (OPR) e três reações de β -oxidações pelas enzimas *Acil CoA oxidase* (ACX), proteína multifuncional (MFP) e *Keto-acil CoA thiolase* (KAT), resultando no ácido jasmônico (WASTERACK, 2007). Esta via biossintética é chamada de via LOX ou via do octadecanóide (Figura 1). O ácido jasmônico produzido nos peroxissomos é então modificado no citosol para produzir os seus derivados. Por exemplo, o ácido

jasmônico é convertido ao composto volátil metil-jasmonato por ação de uma metil-transferase, ou conjugado com alguns aminoácidos por ação de uma enzima aminoácido-sintase codificadas pelo gene *jar1*, a qual promove a conjugação de ácido jasmônico e isoleucina (JA-Ile), que parece ser a molécula responsável pela ativação da sinalização.

Os genes que codificam as enzimas da biossíntese de JA foram identificados, em *Arabidopsis thaliana* (BELL; CREELMAN; MULLET, 1995), assim como cDNAs que codificam para 13-LOX são conhecidos em *Oryza sativa* (PENG et al., 1994), *Solanum tuberosum* (ROYO et al., 1996), *Lycopersicon esculentum* (HEITZ; BERGEY; RYAN, 1996) e *Hordeum vulgare* (VÖRÖS et al., 1998). Sabe-se que a maioria dos genes relacionados à biossíntese de JA são membros de famílias gênicas, havendo assim mais de um gene para cada família e somente determinados genes dentro de cada uma das famílias são os atuantes na via.

Muitos dos processos biológicos em plantas são controlados por moléculas repressoras da sinalização, e cuja degradação sob estímulos ambientais e por fitormônios, fornece uma rápida ativação do sistema. É o caso da sinalização por JA, onde a proteína repressora JAZ é alvo de degradação via complexo proteossômico 26S dependente de ubiquitina (THINES et al., 2007; CHINI et al., 2007), liberando a transcrição de genes responsivos à JA. No modelo atual, JA-Ile promove o reconhecimento de JAZ com o complexo SCF^{COI1}, marcando a proteína JAZ com ubiquitina. COI1 é uma proteína F-box, e este tipo protéico é o responsável pela especificidade do complexo SCF ao alvo. O modelo para a atividade de COI1 é baseado na sinalização por auxina, onde a ligação do complexo SCF^{TIR1} às proteínas repressoras Aux/IAA, resultam na expressão de genes dependentes à auxina (STASWICK, 2008).

A maioria dos genes que codificam enzimas da biossíntese de JA são também induzidas por JA, sugerindo uma regulação por retroalimentação positiva, servindo como indicador do nível elevado de JA (MAUCHER et al., 2000; STENZEL et al., 2003a). Alguns genes da síntese de jasmonato, e genes induzidos somente por esta via foram identificados em bibliotecas de *T. cacao* composta por genes induzidos por indutores de resistência e durante interação com *M. pernicioso* (LEAL JUNIOR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007; VERICA et al., 2004).

De acordo com as avaliações sintomatológicas, histológicas, composição de genes de biblioteca e expressão gênicas da interação *T. cacao* e *M. pernicioso*, este trabalho teve como hipótese que a resposta de resistência à vassoura-de-bruxa seria regulada pelo hormônio vegetal jasmonato. Para verificar a participação deste hormônio na resposta de defesa de *T.*

cacao, seqüências de genes que codificam para enzimas da via foram isolados, identificados e classificados; e a indução e expressão quantitativa foram avaliadas em plantas resistentes e suscetíveis de *T. cacao*.

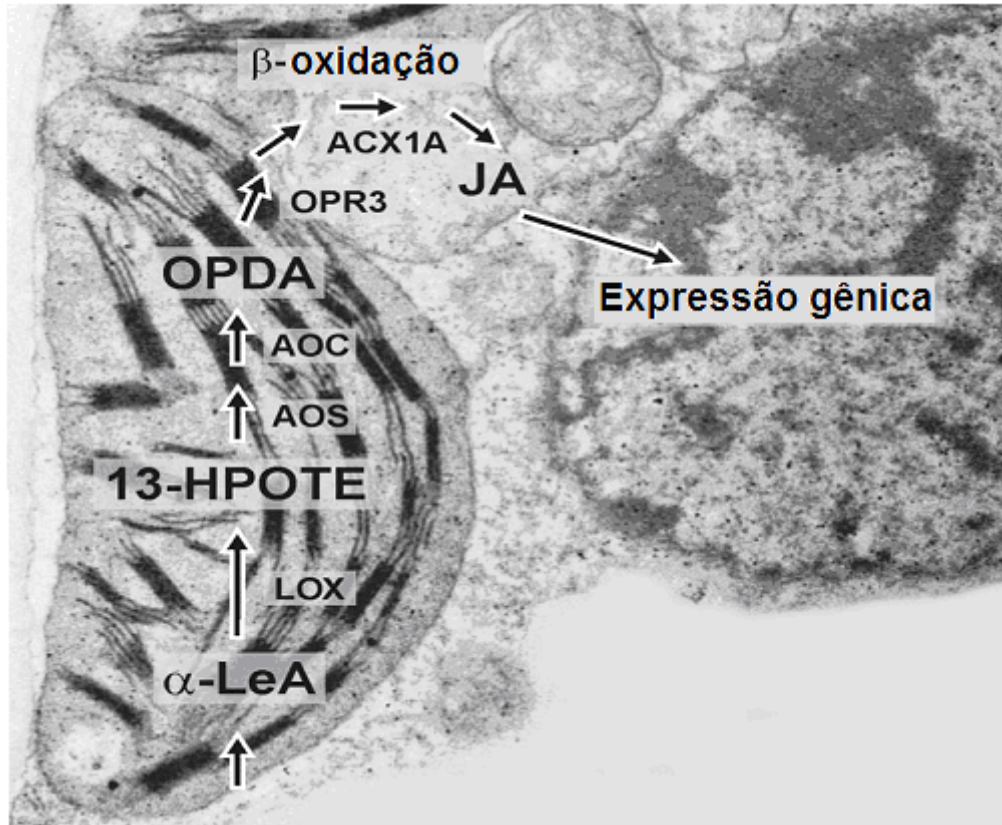


Figura 1 – Via LOX ou via do octadecanóide, responsável pela biossíntese de ácido jasmônico (JA), e a localização intracelular das enzimas e intermediários da biossíntese (WASTERACK, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram desenvolvidos no laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, SP e na 'Estação de Recursos Genéticos 'José Haroldo' (ERJOH) pertencente à Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), Marituba, PA.

3.1 Material vegetal e ensaios

Mudas clonais dos acessos 'CAB 214' (resistente à vassoura-de-bruxa) e 'P7' (suscetível à vassoura-de-bruxa) foram obtidas a partir da enxertia em mudas de cacauero comum. Após o 'pegamento' das borbulhas dos acessos 'CAB 214' e 'P7', foi aguardado o desenvolvimento dos ramos e a formação de folhas novas por 2-3 meses em casa de vegetação na ERJOH.

3.1.1 Tratamento com indutores de resistência

Ácido salicílico (AS – 7,25 mM), metil-jasmonato (MJ – 0,12 mM) e ethefon (ET – 0,1 mM) foram dissolvidos em água e pulverizados nos ápices vegetativos de plantas separadas para cada indutor, sendo 21 plantas de cada acesso para cada tratamento, totalizando 126 plantas. Plantas controle foram pulverizadas com água; as aplicações foram realizadas entre as 10 e 11 horas da manhã. Para cada tratamento, o ápice vegetativo das plantas tratadas foi coletado após 30 min, 1, 2, 4, 6, 24 e 48 h da aplicação, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

3.1.2 Produção de basidiósporos e inoculação

Para obtenção de basidiósporos, vassouras secas coletadas na ERJOH (Marituba, PA) foram expostas a ciclo alternado de umidade e seca (12 h) para induzir a formação de basidiocarpos. Basidiósporos foram coletados numa solução de 16% glicerol, filtrados por membrana de 0,45 μm . Os esporos retidos foram ressuspensos em 2 mL 16% glicerol e armazenados em nitrogênio líquido. O ápice vegetativo de plantas ‘CAB 214’ e ‘P7’, inoculados e não inoculados, foram coletados 6, 24, 48, 72 e 120 h após a inoculação e armazenadas em nitrogênio líquido até a extração de RNA. Para cada período de amostragem, foram amostradas 5 plantas inoculadas e 5 não-inoculadas de cada genótipo. Em cada planta, com auxílio de uma micropipeta foram depositados 30 μl de uma suspensão de basidiósporos de *M. pernicioso* na concentração de 10^5 esporos mL^{-1} , sendo em seguida mantidas em câmara úmida por 24 h.

3.2 Identificação dos genes de biossíntese de jasmonato e demais genes de interesse

Foi realizada a busca de seqüências dos genes de *Theobroma cacao* relacionados à biossíntese de JA (*Lipoxygenase 2 - Lox2*, *Lipoxygenase 3 - Lox3*, *Allene oxide synthase - Aos*, *Allene oxide cyclase - Aoc*, *12-Oxophytodienoate reductase - Opr3*, *Acyl CoA oxidase - Acx*, Proteína multifuncional – *Mfp* e *Keto-acyl CoA thiolase - Kat*); ET (*S-adenosylmethionine synthetase - Samsi*, *1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase - Accox*; AS e fitoalexinas (*Phenylalanine ammonia-lyase - Pal*) e às proteínas repressoras JAZ (*Jasmonate ZIM-domain protein*) e DELLA, nos bancos de dados de EST de *T. cacao* no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); no *Gene Index Computational Biology and Functional Genomics Laboratory* (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>); no *TIGR Plant Transcript Assemblies* (<http://plantta.jcvi.org/>); e de seqüências geradas no próprio laboratório (SILVA, 2005) disponíveis em <http://www.lge.ibi.unicamp.br/cacau/>. Esta busca foi feita através do uso de palavras-chave dos genes e da ferramenta BLAST (*blastx*), a partir de genes conhecidos para *Gossypium* sp., por esta ser uma espécie mais próxima de *T. cacao* e ter mais seqüências disponíveis nos bancos de dados.

3.2.1 Classificação dos genes de biossíntese de jasmonato por análise filogenética

Após a identificação e obtenção das seqüências nucleotídicas de *T. cacao*, estas foram traduzidas e utilizadas para a análise filogenética. Devido as seqüências serem oriundas de bibliotecas de EST, elas traduzem para diferentes regiões da proteína, desta forma, as seqüências de cada gene foram separadas em grupos que traduzem para a mesma região. Como referência para a classificação das seqüências de *T. cacao*, foram buscadas as seqüências de cada um dos membros das famílias gênicas em *Arabidopsis thaliana* e *Gossypium* sp. e identificadas as mesmas regiões dos grupos separados para *T. cacao*. Alinhamento múltiplo dos grupos das seqüências traduzidas de *T. cacao*, *A. thaliana* e *Gossypium* sp., foi realizado através do *Multiple sequence alignment* do INRA (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). As árvores filogenéticas foram obtidas utilizando as funções de máxima parcimônia no programa PAUP 4.0b10 (SWOFFORD, 1998), com valores de *bootstrap* indicando a porcentagem em que cada ramo da árvore obteve a formação apresentada (FELSENSTEIN, 1985). A visualização dos fenogramas foram realizados com o programa TreeView (PAGE, 1996).

3.2.3 Desenho de oligonucleotídeos específicos

A partir dos agrupamentos obtidos pela análise filogenética, foram desenhados oligonucleotídeos específicos para as seqüências dos genes identificados relacionados à via de biossíntese de JA e demais genes de interesse (Tabela 1). Como ferramenta foram utilizados os programas Primer3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>) (ROZEN; SKALETSKY, 2000) e NetPrimer, específico para verificação da estabilidade dos oligonucleotídeos (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>). Os oligonucleotídeos foram diluídos em água (Milli-Q) estéril, sendo o estoque diluído a 50 mM μL^{-1} e a solução de uso, diluída a 5 mM μL^{-1} .

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos específicos utilizados e o tamanho do fragmento esperado na amplificação. F: *Foward*, R: *Reverse*, pb: pares de bases.

Gene	Oligonucleotídeos	Tamanho do fragmento
	F: AAAGCTCATGTCCTTGCTCA	
<i>Lox2</i>	R: ACAATGAGTTCTTAACCAATGACT	69 pb
	F: AAGCTGCTTCACCCTCACAT	
<i>Lox3</i>	R: CCTCAATTATCCCACCTCCA	88 pb
	F: GACCGTGTTTCAGAACCAACA	
<i>Aos</i>	R: CTCTTACCGTCGAGCAAAGC	81 pb
	F: GTGAACTTCCCGAAGAGCTG	
<i>Aoc</i>	R: AATTAGCAACGGTGGCATGT	105 pb
	F: CAGCGATTGGTGCTGATAGA	
<i>Opr3</i>	R: CAAGTTTTGACCCAGCAGT	144 pb
	F: CAACTGCGGATGCTATTGAA	
<i>Acx</i>	R: AGCCCACTGCTTGAAAGGTA	70 pb
	F: AAGACTGCCGCTTTGGAGT	
<i>Kat</i>	R: TTGCAGAGCTCATCGGTATG	97 pb
	F: CCACCTTACAGGGGAGGAAT	
<i>Mfp</i>	R: AAGGCACAAGGCTTGAAAAA	116 pb
	F: CGATGATGTGGGTCTTGATG	
<i>Samsi</i>	R: TGTGACACTGATCACCAGCA	137 pb
	F: CCGAAATCCCTGATCTTGAA	
<i>Accox</i>	R: AGTTGCTCTGCCAGCTTCTC	82 pb
	F: GGCTCTTTGCCAAGCTATTG	
<i>Pal</i>	R: AGCTATCTGGCTCACGGTGT	82 pb
	F: GAGCCTCCAAAAATGGTGAA	
<i>Jaz</i>	R: TATGGCGCTGCACTCATAAC	137 pb
	F: TAAGCAAGCGAGCATGTTGT	
<i>Della</i>	R: ATGCCACCCAAGCATTAAAC	91 pb

3.2.4 Desenho de oligonucleotídeos degenerados para os genes *Lox3* e *Aos*

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar e isolar seqüências dos genes *Lox3* e *Aos* foram desenhados com base nas regiões de consenso observadas pelo alinhamento de seqüências de aminoácidos de *Gossypium* sp. e *A. thaliana*. A partir das seqüências selecionadas, fez-se uma análise de alinhamento múltiplo de seqüências. Desta forma, iniciou-se com uma análise de alinhamento de aminoácidos para identificar as seqüências conservadas e depois se identificou essas mesmas regiões em termos de nucleotídeos, tanto para *Lox3* quanto para *Aos*. Foram utilizadas as regiões mais conservadas e realizou-se a substituição da base a qual não havia identidade pela base degenerada correspondente, conforme tabela para bases degeneradas. Os oligonucleotídeos utilizados foram para *Lox3* (F: GBKCHAAYGAYGCYGGTGT; R: CTCCHTRTCRAABCGCCA) e para *Aos* (F: GAYTAYTTYTACRACCAAGG; R: THVGTTGANGRCATGTAAGT).

3.3 Extração de RNA total e quantificação

Foi utilizado o protocolo proposto pelo Prof. Mark Guiltinan, *Penn State University* (<http://guiltinanlab.cas.psu.edu/Research/Cocoa/protocols.htm>). O RNA total é extraído de 120 mg de tecido, o qual é macerado em N líquido e transferido para um tubo de centrífuga de 2 mL, onde é adicionado 1 mL de tampão de extração (2 % CTAB; 2% PVP; 100m M Tris; 5 mM EDTA; 2 M NaCl; 2% β -mercaptoethanol). Após a homogeneização, adiciona-se 1 mL clorofórmio, mistura-se e centrifuga-se a 9000 g por 20 min a 4°C. Cerca de 0,6 mL do sobrenadante é transferido para um novo tubo de 2 mL, e o RNA total é precipitado com volume de 0,54 mL da solução 8 M de cloreto de lítio, após incubação a 4°C por 12 h. O RNA total é precipitado por centrifugação a 9000 g por 30 min. O RNA total precipitado é então purificado com o kit *RNAeasy* da Qiagen (Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do RNA total extraído foi confirmada por eletroforese em gel de 1,0 % agarose em tampão 1X SB (20X SB: 8 g de NaOH; 1 L de H₂O miliQ; pH 8,0 ajustado com ácido bórico) corado com brometo de etídio, aplicando-se uma alíquota de 3 μ L do RNA total extraído de cada amostra. Com o objetivo de determinar a concentração e

pureza do RNA total extraído, uma alíquota de 3 μ L foi retirada para quantificação de RNA em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro, Amersham Biosciences).

3.3.1 Tratamento com DNase e síntese de cDNA

Após a quantificação, cerca de 1,5 μ g de RNA foram submetidas a tratamento com DNAase I (Fermentas). Para tanto, seguiram-se as especificações do fabricante, utilizando-se 1 U de DNAase I, 1 U de RNAaseout (Invitrogen), 1X de tampão da DNAase, para um volume final da reação de 10 μ L. O tubo foi incubado em um termociclador nas seguintes condições: 37°C por 30 min, 25°C por 2 min (nesse momento foi adicionado 1 μ L de EDTA), seguindo-se 65°C por 10 min e 4°C para a inativação da enzima. Em seguida, foi realizada a síntese da primeira fita do cDNA utilizando-se o RNA total tratado, seguindo as especificações do *kit* para síntese de cDNA (Promega). Para tanto, foram utilizado todo o volume do RNA total tratado e 2,5 mM de Oligo dT, incubado à 70°C por 5 min e resfriado à 4°C por 5 min. Após foi adicionado 1X do tampão Improm II *buffer*; 3 mM de MgCl₂; 0,5 mM de dNTP; 1 U de RNAaseout; 1 U da enzima Improm II Transcriptase Reversa (Promega) e água (Milli-Q) estéril tratada com DEPC a 0,01%, para completar um volume final da reação de 22 μ L. A reação de transcrição reversa foi incubada nas seguintes condições: 25°C por 5 min, 42°C por 60 min, 70°C por 15 min e 4°C.

3.4 PCR e análise em gel de agarose

Para a amplificação do cDNA foram conduzidas reações de amplificação contendo os seguintes componentes: 0,5 U de Taq DNA Polimerase; 1X de *Taq* DNA Polimerase *Buffer*; 0,2 mM dNTP; 2 mM MgCl₂; 0,1 μ M de cada oligonucleotídeo específico e água (Milli-Q) autoclavada para completar um volume final de 25 μ L. A temperatura para anelamento dos oligonucleotídeos utilizados foi de 60°C, exceto para oligonucleotídeos degenerados, os quais se utilizou a temperatura de anelamento de 48°C. As etapas de amplificação foram de desnaturação inicial de 95°C por 2 min; 40 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C ou 48°C por 30 s e 72°C por 30 s; e extensão final à 72°C por 5 min. Os fragmentos obtidos com as reações de

PCR foram analisados através de eletroforese em gel de 1% agarose em tampão 1X SB. A cada uma das amostras foi adicionado um volume adequado de tampão de carregamento (0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol; e 15% ficol tipo 400-DL) contendo o corante SYBR *Gold nucleic acid gel stain* (Invitrogen).

3.4.1 Purificação dos fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos

Todos os fragmentos amplificados pelos oligonucleotídeos específicos e degenerados relacionados à biossíntese de JA, gerados por RT-PCR a partir de cDNA, foram isolados e purificados utilizando o *kit GFX gel band purification* (Amersham Biosciences). Com a ajuda de um bisturi com lâmina nova estéril, recortou-se do gel de 1% agarose a banda alvo de cada oligonucleotídeo e submeteu-se em seguida a pesagem em balança analítica. A fatia do gel foi cortada em mínimos pedaços, que foram depositados num tubo tipo Eppendorf. Foi adicionado 10 μ L do tampão de captura para cada 10 mg da fatia do gel. Em seguida agitou-se, com auxílio de *vortex*, a mistura vigorosamente e posteriormente incubou-se a amostra a 60°C em banho-maria até o gel de agarose se dissolver completamente, por cerca de 5 a 15 min. Após esse passo, a mistura foi depositada na coluna de captura GFX e incubada a temperatura ambiente por 1 min. Foi realizada uma centrifugação por 30 s à velocidade máxima (15000 g) e descartou-se o líquido presente no fundo do tubo. Neste passo os fragmentos presentes na amostra ficaram retidos na coluna. Em seguida foram adicionados 500 μ L de tampão de lavagem (Tris EDTA *buffer*: 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 80% de etanol) à coluna. Submeteu-se o tubo a centrifugação por 30 s à velocidade máxima (15000 g). Após a centrifugação, descartou-se o líquido formado no fundo do tubo e transferiu-se a coluna GFX para um novo tubo tipo Eppendorf. À coluna, adicionou-se 30 μ L de água (Milli-Q) autoclavada. Em seguida, incubou-se a amostra a temperatura ambiente por 1 min. Após esse tempo, centrifugou-se a amostra à velocidade máxima (15000 g) por 1 min para recuperar o fragmento amplificado presente na coluna GFX.

3.4.2 Clonagem dos fragmentos

Os fragmentos purificados foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega), obedecendo a relação molar entre o inserto e o vetor de 3:1, utilizando-se 0,3 U da enzima T4 DNA Ligase; 1X do tampão de ligação da T4 DNA Ligase; 5 ng do vetor pGEM-T Easy e 2 μ L do fragmento de PCR purificado, em um volume final de 10 μ L. A mistura foi incubada a 4°C *overnight* para que a reação de ligação dos fragmentos ao vetor pudesse ser viabilizada. Em seguida, armazenou-se a reação a -20°C. Após a ligação o próximo passo foi transformar bactérias da cepa DH10B de *Escherichia coli* pelo método de eletroporação.

3.4.3 Transformação por eletroporação e seleção dos transformantes

Em um tubo Eppendorf contendo 40 μ L de células eletrocompetentes da cepa DH10B de *Escherichia coli*, foi adicionado 1 μ L de uma reação de clonagem, contendo o plasmídeo a ser transferido às bactérias. Após ligeira homogeneização, a mistura de células e plasmídeos foi transferida para uma cubeta de eletroporação, previamente resfriada no gelo. A cubeta foi colocada no eletroporador Micropulser (BioRad) e um pulso de corrente elétrica de 1.8 kV foi aplicado. Imediatamente, foi adicionado na cubeta 1 mL de meio SOC (2% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,5 μ M de NaCl; 2,5 mM de KCl; 10 mM MgCl₂; e 20 mM de glicose filtrada e esterilizada). Após a mistura, o conteúdo da cubeta foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, o qual foi incubado sob agitação por 1 h a 37°C. Em seguida, o tubo foi ligeiramente centrifugado, por 5 min a 370 g. O sobrenadante foi descartado deixando restar apenas 100 μ L do líquido, necessário para ressuspender o precipitado de células centrifugadas. Foram adicionados previamente sobre o meio de cultura LB sólido o antibiótico de seleção 100 μ g mL⁻¹ ampicilina e os compostos para seleção dos transformantes recombinantes, 20 μ L de solução 0,12 M X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) e 40 μ L de 100 mM IPTG (*isopropyl β -D-thiogalactopyranoside*). Os 100 μ L ressuspensos foram então plaqueados em meio e as placas foram incubadas durante 12 a 16 h em estufa a 37°C. Depois desse período as colônias brancas foram selecionadas, e retiradas com auxílio

de um palito de madeira e colocadas novamente em crescimento em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio LB líquido com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ampicilina.

3.4.4 Extração de DNA plasmidial (Mini-preparação)

Após 16 a 20 h de crescimento a 37°C sob rotação de 120 rpm, as culturas foram transferidas para tubos Eppendorf e centrifugadas a 15000 g por 1 min. Descartado o sobrenadante de cada tubo, novamente 1,5 mL de cultura foi transferido para o microtubo e centrifugadas novamente a 15000 g para aumentar o rendimento da minipreparação. Em seguida, o precipitado de células de cada tubo foi totalmente ressuscitado em 300 μL de Solução I (50 mM glucose, 0,25mM Tris-HCl pH 8, e 10 mM $\text{Na}_2\cdot\text{EDTA}$) com a ajuda de *vortex* e incubou-se a solução a temperatura ambiente por 10 min. O próximo passo foi acrescentar 300 μL de Solução II (0,2 M NaOH e 1,0% SDS), misturar por inversão e incubar no gelo por 5 min. A seguir, acrescentou-se 300 μL de Solução III (3 M KOAc pH 5,5), e misturou-se a solução por inversão e incubou-a no gelo por 5 min. Posteriormente, realizou-se uma centrifugação por 10 min a 15000 g e transferiu-se o sobrenadante de cada tubo para novos microtubos, aos quais foram adicionados 500 μL de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a -20°C por aproximadamente 15 min, seguido de uma centrifugação a 15000 g por 15 min. Em seguida, o líquido sobrenadante dos tubos foi descartado e foi feita a lavagem do precipitado com 500 μL de 70% etanol, submetidos conseqüentemente a mais uma centrifugação a 15000 g por 5 min. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente até que as amostras secassem e posteriormente as amostras foram ressuscitadas em 30 μL de água (Milli-Q) autoclavada. As amostras foram então quantificadas em fluorômetro DyNA Quant 200 (Hoefler).

3.4.5 Confirmação de presença de insertos por PCR e digestão enzimática

Para confirmar a presença do inserto nos plasmídeos isolados, as amostras foram diluídas para $25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, e foram realizadas novas reações de PCR utilizando os

oligonucleotídeos específicos e degenerados e também com os oligonucleotídeos T7 (5'-CCCTATAGTGAGTCGTATTA-3') e SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'), os quais possuem sítios de anelamento no vetor pGEM-T *Easy*, flanqueando a região em que o fragmento foi inserido. As reações ocorreram nas mesmas condições que as citadas acima. Em seguida, o resultado dessas reações foi analisado por eletroforese em gel de 1% agarose em tampão 1X SB. Também foram feitas digestões de cada DNA plasmidial recuperado, utilizando a enzima de restrição *EcoRI* (Promega), a partir dos quais se recuperaria o inserto dos vetores transformados. Para isso 1 μL do DNA plasmidial; 0,3 U de *EcoRI* (Promega); 2 μL de tampão específico em volume final de 20 μL . O período de incubação da reação durou 1 h a 37°C.

3.4.6 Sequenciamento

Cada molécula de DNA a ser sequenciada foi submetida a reações de amplificação contendo separadamente um dos oligonucleotídeos T7 ou SP6. As amostras de DNA foram submetidas ao seguinte protocolo de reação, realizada em termociclador, seguindo orientações do kit DYEnamic ET *Terminator cycle sequencing* (Amersham Biosciences): amostra de DNA a ser sequenciada (100-150 ng), 1X tampão Save\$, mix kit (1 μL); 0,3 μM de oligonucleotídeo T7 ou SP6; e água (Milli-Q) autoclavada, para um volume final de 10 μL . A reação foi submetida inicialmente a desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos com passos de 95°C por 20 s, 50°C por 15 s e 60°C por 1 min, e finalizada com extensão final à 72°C por 10 min. Em seguida as amostras foram submetidas ao processo de precipitação onde foram adicionados 80 μL de 65% isopropanol em cada tubo Eppendorf, seguido de leve agitação em *vortex*. A mistura foi encubada a temperatura ambiente e no escuro por 15 min e em seguida centrifugou-se a 1.479 g à 20°C por 45 min. Após esse processo, o sobrenadante foi descartado por inversão e o excesso retirado com auxílio de papel toalha, invertendo os tubos sobre a folha de papel. Foram então adicionados 150 μL de 60% etanol gelado a cada tubo. Seguiu-se nova centrifugação a 1479 g a 20°C por 15 min e novamente o sobrenadante foi descartado e o excesso retirado com o auxílio de papel toalha. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente e no escuro por 1 h para que pudessem secar por completo e até a realização do passo a seguir as amostras foram armazenadas a -20°C. A cada tubo foram adicionados 10 μL de formamida seguido de agitação em *vortex* e

em seguida cada amostra foi encaminhada para o sequenciador ABI-3100 do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, gentilmente disponibilizado pela Prof. Siu Mui Tsai. Às seqüências de bases nucleotídicas adquiridas com o sequenciamento, aplicou-se a ferramenta BLAST do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para verificar similaridade com as seqüências dos genes de interesse correspondente presente no banco de dados.

3.5 Determinação da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

As análises de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) foram realizadas em termociclador centrífugo RotorGene 3000 (Corbett *Life Science*) a partir de diluição 10^{-1} do cDNA total, derivado da transcrição reversa das amostras de RNA. As reações de amplificação foram realizadas no volume final de 10 μ L utilizando-se 1 μ L de cDNA; 0,5 μ M dos iniciadores gene-específicos e 1X de *Platinum SYBR-green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen). A amplificação foi conduzida em incubações iniciais a 50°C por 2 min, 95°C por 2 min e seguidas de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 30 s, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. Após o término dos ciclos de reações foram determinadas as curvas de dissociação de cada produto amplificado entre 72°C e 95°C (curva de *melting*). Duplicatas técnicas de cada amplificação foram realizadas, e os experimentos incluíram controle negativo contendo água sem cDNA. A eficiência de amplificação de cada par de iniciadores foi determinada por curva padrão com três diluições seriais de um *pool* dos cDNAs utilizados (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) e pelo coeficiente R^2 resultante. A aquisição dos dados em tempo real foi efetuada com o programa *RotorGene Real-Time Analysis 6.0* (Corbett *Life Science*). O valor médio de C_T (*cycle threshold*) das duplicatas foi utilizado para determinar a diferença da expressão entre o tratamento (AS, ET, MJ ou plantas inoculadas) e o controle (água ou plantas não inoculadas). Para a normalização em cada uma das amostras analisadas, calculou-se a variação quantitativa de expressão dos genes relacionados à biossíntese de JA e os demais genes de interesse (alvos) de forma relativa aos quatro genes normalizadores *Actina*, *Rpl35*, *Gapdh* e *Tubulina B*, com o auxílio do programa *Relative Expression Software Tool 2008* (REST 08), de autoria de Pfaffl, Horgan e Dempfle (2002) (<http://rest.gene-quantification.info/>). As seqüências dos oligonucleotídeos dos genes normalizadores se encontram no apêndice C.

3.5.1 Detecção de transcritos de *M. pernicioso*

A presença do fungo *M. pernicioso* nos ápices vegetativos inoculados ou não de *T. cacao* foi verificada por RT-qPCR. Iniciadores específicos de *M. pernicioso* para o gene da proteína ribossomal Rpl35 (LEAL JUNIOR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007) e da proteína Aspf13 (LEAL JUNIOR, 2006) foram utilizados (Apêndice C). O cDNA de tecido infectado das amostras coletadas com 6, 24, 48, 72 e 120 h dos acessos ‘CAB 214’ e ‘P7’ foram analisadas, empregando o fragmento amplificado do cDNA de *M. pernicioso* cultivado *in vitro* como controle positivo. A detecção foi baseada na curva de dissociação específica para os produtos de PCR. Os valores de C_T foram usados para determinar a expressão gênica pelo método $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A expressão foi determinada tendo como referência interna o gene da *Actina* de *T. cacao* e os valores de expressão foram relativos à primeira detecção dos genes (6 h), e as reações para estes genes foram realizadas com amostras diluídas 10^{-1} .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação dos genes de biossíntese de jasmonato e demais genes de interesse

Foram identificadas diversas seqüências referentes aos genes de biossíntese de jasmonato nas diversas bibliotecas e bancos de dados por meio da busca por palavras-chave e da ferramenta *Blastx* (Tabela 2). Foram identificadas nove seqüências do gene *Lox*; quatro seqüências de *Aoc*; onze de *Opr*; seis de *Acx*; sete de *Kat*; e quatro de *Mfp*. Os genes da via de biossíntese de JA, *Aos* e *Lox3* não foram encontrados em nenhum dos bancos de dados, o que levou a sua busca por iniciadores degenerados desenhados a partir de regiões conservadas de *Gossypium sp.* e *A. thaliana*. Dos genes *Samsi*, *Accox*, *Pal*, *Jaz* e *Della*, foram identificadas apenas uma seqüência (Tabela 2).

Tabela 2 - Enzimas da biossíntese de jasmonato e demais genes de interesse com seqüências de genes identificados de *T. cacao* e respectivas bibliotecas de origem. Os acessos EST com iniciais CF, CA, KZ0 são originados do *GenBank*; TC, TA do *Gene Index* e TIGR Plant Transcript, respectivamente; e iBINT, CL em <http://www.lge.ibi.unicamp.br/cacau/>. A marcação * indica as seqüências utilizadas para o desenho dos oligonucleotídeos específicos.

Enzimas da biossíntese	Código EC	Acesso EST	Biblioteca
		CF973956.1	Folha
		CA794714	Semente e folha
		CA798101	Semente e folha
		CA798157	Semente e folha
<i>Lipoxygenase</i> (LOX)	1.13.11.12	iBINT-RT-001-001-E07- UE.F	Semente
		KZ0ABB7YM24FM1	Cotilédone
		*KZ0ABB14YF22FM1	Cotilédone
		KZ0ABB11YE08FM1	Cotilédone
		* KZ0AAT1YJ11RM1	Córtex
			“Continua”

			“Continuação”
Enzimas da biossíntese	Código EC	Acesso EST	Biblioteca
<i>Allene Oxide Synthase</i> (AOS)	4.2.1.92	Não encontrado	--
		* CF973875.1	Folha
<i>Allene Oxide Cyclase</i> (AOC)	5.3.99.6	* CL144Contig1	--
		* KZ0AAV4YJ08FM1	Córtex
		* KZ0AAC2YD09FM1	Fruto em desenvolvimento
		CF972770.1	Folha
<i>12-oxophytodienoate reductase</i> (OPR)	1.3.1.42	CF974179.1	Folha
		CF974183.1	Folha
		CF974065.1	Folha
		CF974195.1	Folha
		KZ0ABE10YM04FM1	Folha
		KZ0ACL2YM05FM1	Frutos em desenvolvimento
		TC212	Folha
		CA798318	Semente e folha
		* iBINT-RT-001-027-F06-UE.F	Semente
		iBINT-RT-001-047-B08-UE.F	Semente
<i>Acyl-CoA oxidase</i> (ACX)	1.3.3.6	CF973580.1	Folha
		TC424	Folha
		TA1131_3641	Folha
		* KZ0ABF8YN04FM1	Raiz

“Continua”

			“Conclusão”	
Enzimas da biossíntese	Código EC	Acesso EST	Biblioteca	
<i>Acyl-CoA oxidase</i> (ACX)		KZ0ACAA1YF16FM1	Cambio e casca	
		* KZ0ABF9YN04FM1	Raiz	
<i>3-keto-acyl-CoA thiolase</i> (KAT)	2.3.1.16	* KZ0AAT7YD06FM1	Córtex	
		KZ0AAS2YC24FM1	Epicótilo	
		KZ0AAT10YB24FM1	Córtex	
		KZ0ABA3YA03FM1	Embrião Fruto em desenvolvimento	
		CL108Contig1 CL65Contig1 iBIEM-NT-001-020-B04-CE.F	Fruto em desenvolvimento Semente	
Proteína multifuncional (MFP)	<i>L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase</i>	1.1.1.35	*KZ0ABB12YI05FM1 *KZ0ABB14YF15FM1	Cotilédone Cotilédone
		<i>2-trans-enoyl-CoA hydratase</i>	4.2.1.17	CL96Contig1
	KZ0AAA10YO13FM1			Ramo
<i>S-adenosylmethionine synthetase</i> (SAMsi)	2.5.1.6	* iBINT-SP-001-061-H06-UE.F	Semente	
<i>1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase</i> (ACCOx)	1.14.17.4	* iBINT-RT-001-027-C10-UE.F	Semente	
<i>Phenylalanine ammonia-lyase</i> (PAL)	4.3.1.24	* CF974594.1	Folha	
<i>Jasmonate ZIM-domain protein</i> (JAZ)	-	* TA755_3641	Semente e folha	
DELLA	-	* iBINT-RT-001-014-B09-UE.F 527-607	Semente	

4.1.2 Classificação dos genes de biossíntese de jasmonato por análise filogenética

Nos primeiros passos para classificação das seqüências encontradas, foi verificado que as seqüências representantes do mesmo gene apresentavam baixa similaridade entre elas quando realizado o alinhamento de todas juntas. Foi conduzido *Blastx* de todas elas, e observou-se que cada uma destas seqüências traduziam para diferentes regiões da proteína correspondente, o que inviabilizava o alinhamento de todas elas conjuntamente. Desta forma foi buscada a região protéica a qual cada uma das seqüências obtidas traduzia, para que fosse realizado o alinhamento somente das que possuíam a mesma região, e posterior análise filogenética (Apêndice A).

Na literatura, foi verificado que cada um dos genes de biossíntese de JA normalmente são membros de famílias gênicas e que há especificidade com determinado gene da família e a via de biossíntese de jasmonato (Apêndice B). Por exemplo, para o gene *12-oxophytodienoate reductase (Opr)* existem a *Opr1*, a *Opr2* e a *Opr3* em *Arabidopsis*, sendo o gene *Opr3* o mais específico para a via de biossíntese de jasmonato (Matsui et al., 2004). Desta forma foi realizada uma classificação das seqüências obtidas de *T. cacao*, a fim de se buscar os genes mais específicos da via dentro de cada uma das famílias gênicas.

Foram feitas análises filogenéticas de todas as seqüências encontradas nos bancos de dados de *T. cacao*. Devido às seqüências encontradas de um mesmo gene traduzirem para diferentes regiões da proteína, como relatado anteriormente, foram obtidas mais de uma árvore dentro de cada gene, cada qual com seqüências que traduziam para a mesma região protéica (dados não mostrados). Uma única árvore de cada gene, com a classificação somente das seqüências de *T. cacao* utilizadas no desenho dos oligonucleotídeos é mostrada a seguir.

A árvore filogenética obtida do gene *Lox*, demonstra uma maior similaridade de todas as seqüências de *T. cacao* oriundas dos bancos de dados, com o gene *Lox2* de *A. thaliana* (Figura 2). No caso da seqüência do gene *Lox3* de *T. cacao* apresentada na Figura 1, foi necessário explorar a amplificação de DNA utilizando oligonucleotídeos degenerados para obtenção da seqüência.

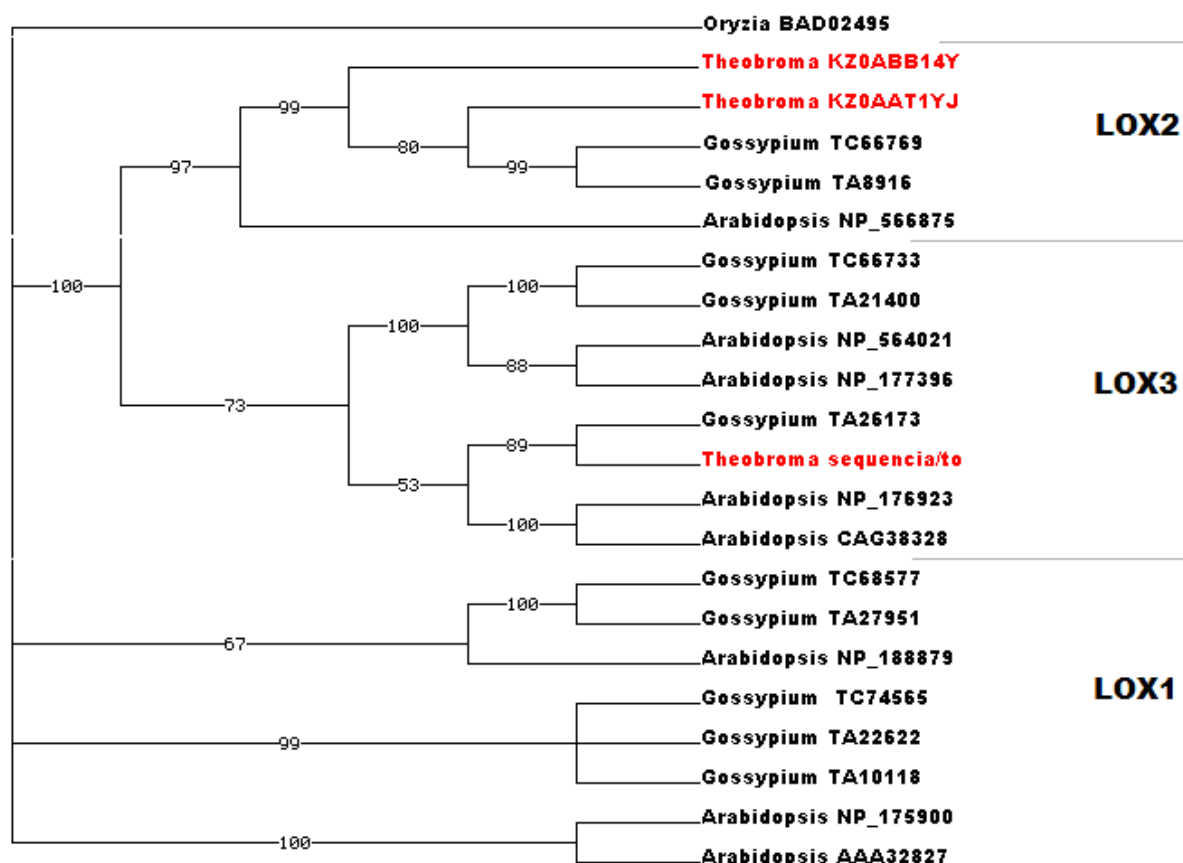


Figura 2 - Classificação das seqüências traduzidas do gene *Lox* encontradas em *Theobroma cacao* obtidas após alinhamento múltiplo de seqüências com o programa ClustalW, e utilizando as funções de máxima parcimônia no programa PAUP 4.0b10, com valores de *bootstrap*, baseado em 100 repetições, indicando a porcentagem em que cada ramo da árvore obteve a formação apresentada. A visualização dos fenogramas foram realizados com o programa TreeView. A identificação do acesso aos bancos de dados estão incluídas na figura.

O gene *Aos* possui uma cópia única em *A. thaliana* (KUBIGSTELTIG; LAUDERT; WEILER, 1999) e não foi identificado em bancos de dados de *T. cacao*. Em *Solanum tuberosum* existem os membros *Aos1*, *Aos2* e *Aos3*, enquanto que em *Glycine max* se encontra a *Aos1* e *Aos2*. Para obter a seqüência do gene *Aos* de *T. cacao*, também foi necessário clonar um produto de PCR amplificado por oligonucleotídeos degenerados (ver próxima seção). A seqüência de *T. cacao* obtida pelos oligonucleotídeos degenerados quando analisada demonstrou estar mais próximo da AOS de *A. thaliana* e das AOS1 e AOS2 de *S. tuberosum* (Figura 3).

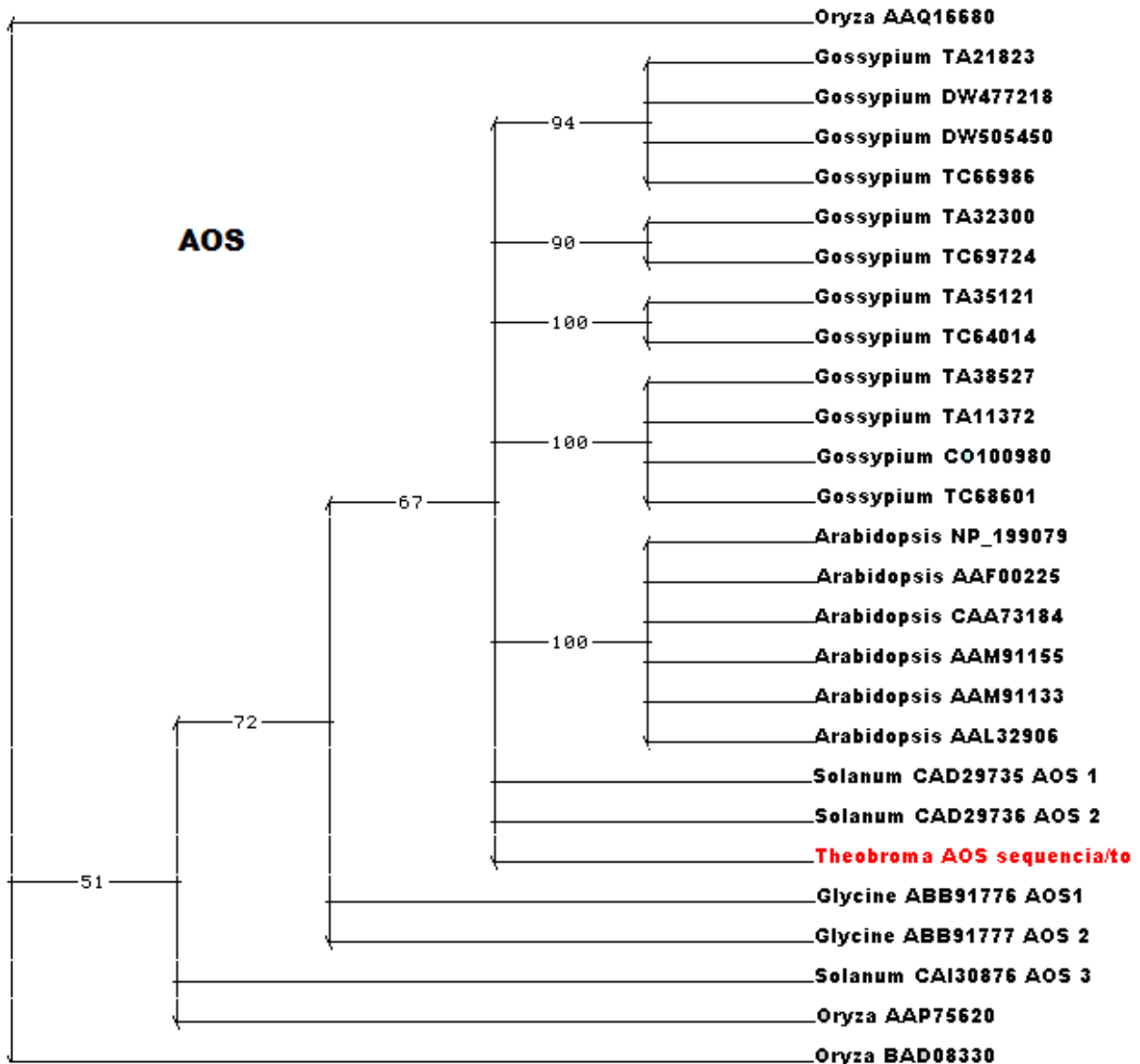


Figura 3 - Classificação das seqüências traduzidas do gene *Aos* encontradas em *Theobroma cacao* obtidas após alinhamento múltiplo de seqüências com o programa ClustalW, e utilizando as funções de máxima parcimônia no programa PAUP 4.0b10, com valores de *bootstrap*, baseado em 100 repetições, indicando a porcentagem em que cada ramo da árvore obteve a formação apresentada. A visualização dos fenogramas foram realizados com o programa TreeView. A identificação do acesso aos bancos de dados estão incluídas na figura.

Todos os membros da família *Aoc* participam da via de biossíntese de jasmonato, não tendo sido demonstradas ainda as especificidades de cada membro. Na análise, estas seqüências se agruparam de acordo com a espécie (Figura 4). Em *A. thaliana* existem os genes *Aoc1*, *Aoc2*, *Aoc3* e *Aoc4*, e Stenzel et al. (2003b) por meio de análise filogenética verificou que as AOCs de *A. thaliana* formaram um sub-grupo separado de briófitas, monocotiledôneas e gimnospermas.

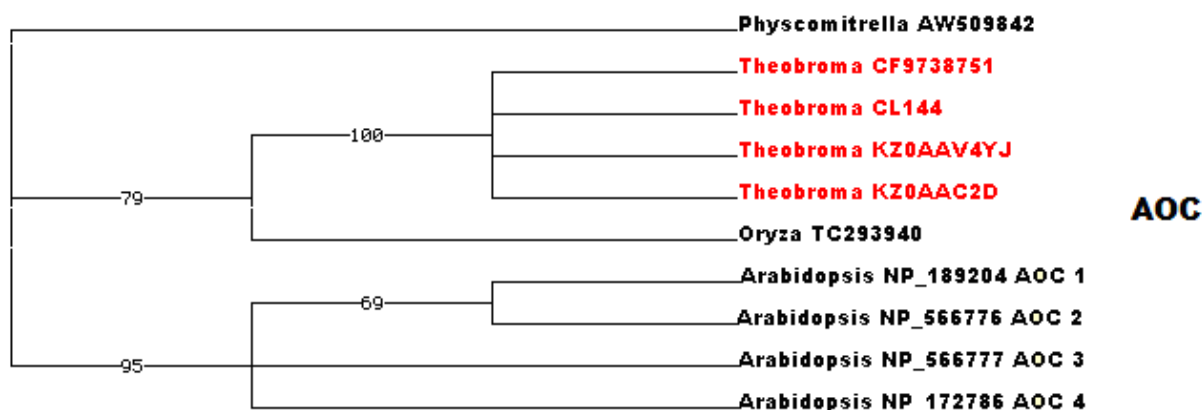


Figura 4 - Classificação das seqüências traduzidas do gene *Aoc* encontradas em *Theobroma cacao* obtidas após alinhamento múltiplo de seqüências com o programa ClustalW, e utilizando as funções de máxima parcimônia no programa PAUP 4.0b10, com valores de *bootstrap*, baseado em 100 repetições, indicando a porcentagem em que cada ramo da árvore obteve a formação apresentada. A visualização dos fenogramas foram realizados com o programa TreeView. A identificação do acesso aos bancos de dados estão incluídas na figura.

No caso do gene *Opr*, somente o membro *Opr3* possui especificidade com a via de biossíntese de ácido jasmônico, através da redução do ácido oxo-fitodienólico (OPDA) (Matsui et al., 2004). Dentre as onze seqüências encontradas nos bancos de dados de *T. cacao* somente uma delas apresentou maior similaridade e se agrupou com esta específica OPR3 (Figura 5), sendo esta usada no desenho do oligonucleotídeo. Não foi possível determinar as demais seqüências em relação à OPR1 ou OPR2.

Na etapa de β -oxidação, três enzimas participam até a geração do produto final, que é o ácido jasmônico. Dentre as ACXs, somente a ACX1 e a ACX5 realizam esta função em *A. thaliana* (SCHILMILLER; KOO; HOWE, 2007). Duas seqüências similares à *Acx1* e *Acx5*, as quais se agruparam no mesmo ramo, foram utilizadas no desenho dos oligonucleotídeos (Figura 6).

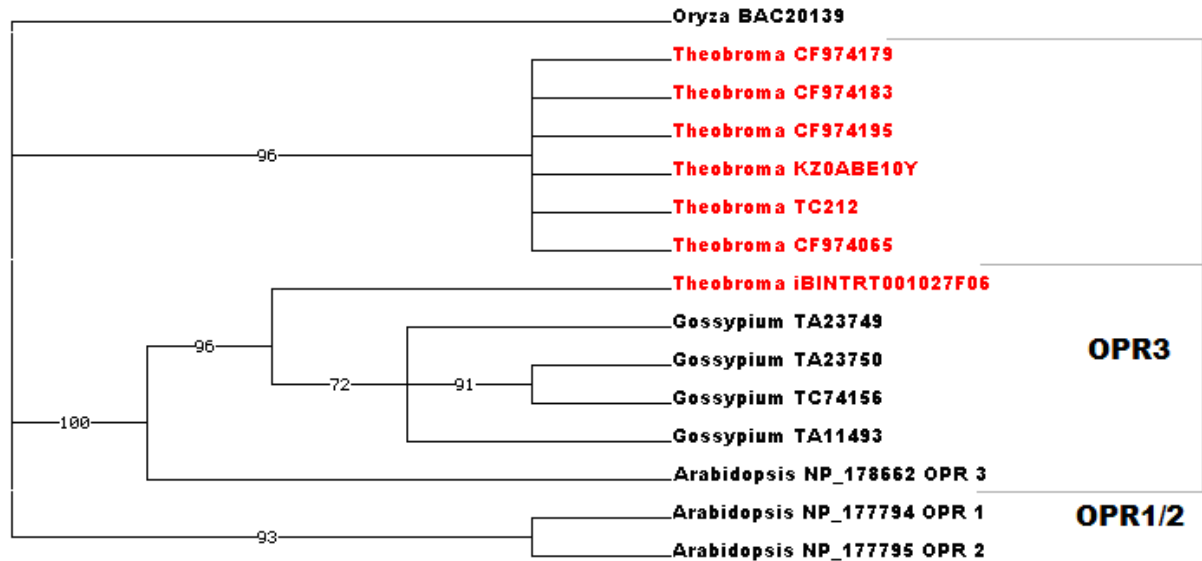


Figura 5 - Classificação das seqüências traduzidas do gene *Opr* encontradas em *Theobroma cacao* obtidas após alinhamento múltiplo de seqüências com o programa ClustalW, e utilizando as funções de máxima parcimônia no programa PAUP 4.0b10, com valores de *bootstrap*, baseado em 100 repetições, indicando a porcentagem em que cada ramo da árvore obteve a formação apresentada. A visualização dos fenogramas foram realizados com o programa TreeView. A identificação do acesso aos bancos de dados estão incluídas na figura.

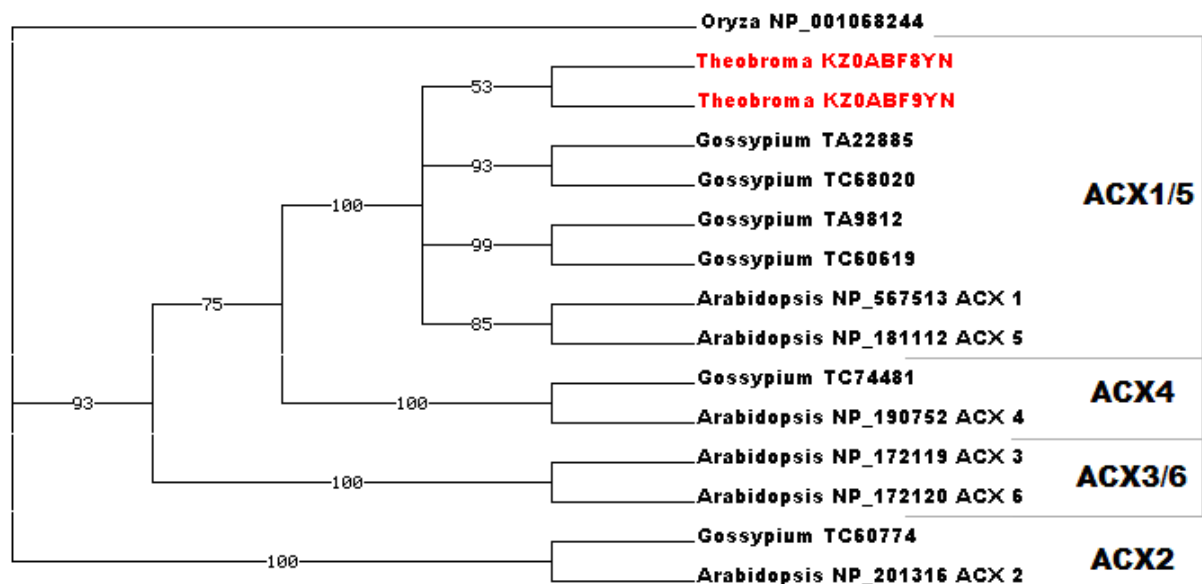


Figura 6 - Classificação das seqüências traduzidas do gene *Acx* encontradas em *Theobroma cacao* obtidas após alinhamento múltiplo de seqüências com o programa ClustalW, e utilizando as funções de máxima parcimônia no programa PAUP 4.0b10, com valores de *bootstrap*, baseado em 100 repetições, indicando a porcentagem em que cada ramo da árvore obteve a formação apresentada. A visualização dos fenogramas foram realizados com o programa TreeView. A identificação do acesso aos bancos de dados estão incluídas na figura.

A proteína multifuncional (MFP) possui pelo menos duas atividades enzimáticas distintas, sendo uma de desidrogenase, catalisada pela enzima β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase e outra hidratase, catalisada pela *enoyl-CoA hydratase*. Existem pelo menos duas MFPs em *Arabidopsis*, a MFP2 e a AIM1 (DELKER et al., 2007). De acordo com a análise conduzida, as seqüências de *T. cacao* apresentaram maior similaridade com a *Mfp2* (Figura 7).

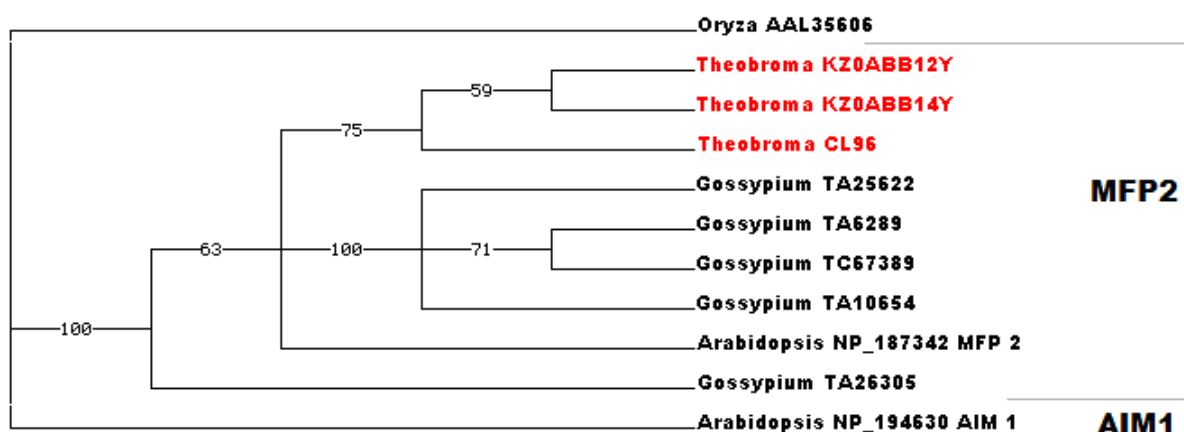


Figura 7 - Classificação das seqüências traduzidas do gene *Mfp* encontradas em *Theobroma cacao* obtidas após alinhamento múltiplo de seqüências com o programa ClustalW, e utilizando as funções de máxima parcimônia no programa PAUP 4.0b10, com valores de *bootstrap*, baseado em 100 repetições, indicando a porcentagem em que cada ramo da árvore obteve a formação apresentada. A visualização dos fenogramas foram realizados com o programa TreeView. A identificação do acesso aos bancos de dados estão incluídas na figura.

A última enzima da via é a KAT, a qual possui três membros, e somente o gene *Kat1* não participa na formação do ácido jasmônico, e o número de isoformas de cada uma delas é referente ao número do cromossomo onde são encontradas em *A. thaliana* (CASTILLO et.al., 2004). Pela análise filogenética, não foi possível separar as seqüências de KAT1 das seqüências de KAT2, e somente uma seqüência (KZ0AAT7YD06FM1) apresentou maior similaridade com a KAT5 de *A. thaliana* (Figura 8).

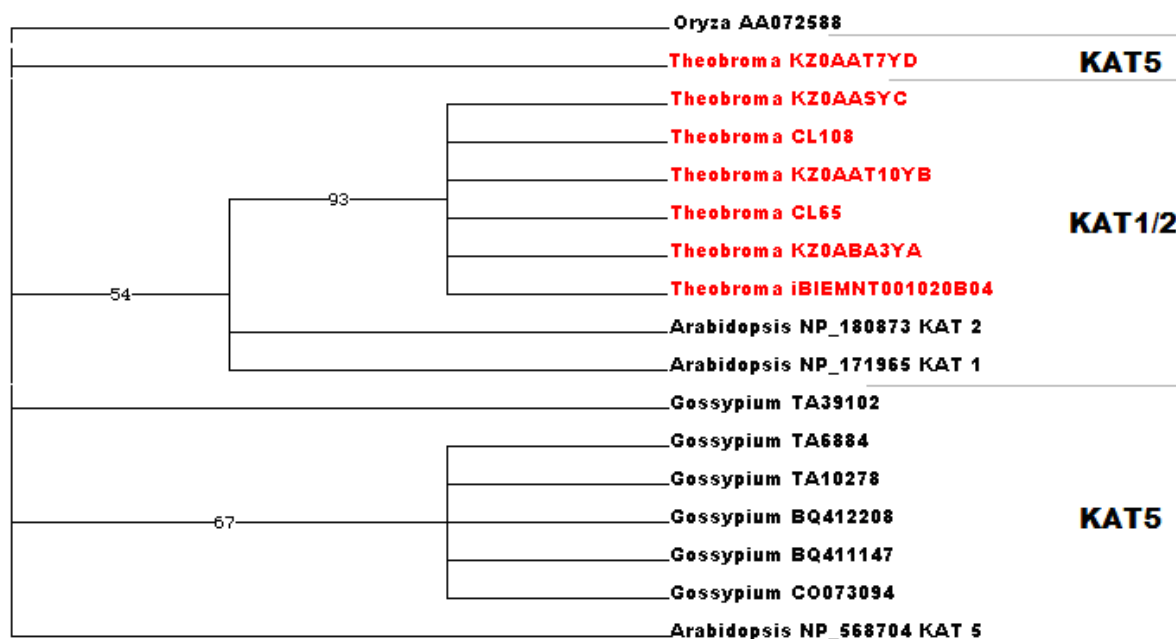


Figura 8 - Classificação das seqüências traduzidas do gene *Kat* encontradas em *Theobroma cacao* obtidas após alinhamento múltiplo de seqüências com o programa ClustalW, e utilizando as funções de máxima parcimônia no programa PAUP 4.0b10, com valores de *bootstrap*, baseado em 100 repetições, indicando a porcentagem em que cada ramo da árvore obteve a formação apresentada. A visualização dos fenogramas foram realizados com o programa TreeView. A identificação do acesso aos bancos de dados estão incluídas na figura.

4.2 Amplificações a partir dos oligonucleotídeos específicos

Foram desenhados oligonucleotídeos específicos para todos os genes identificados. Em relação aos genes relacionados à biossíntese de JA (*Lox2*, *Lox3*, *Aos*, *Aoc*, *Opr3*, *Acx*, *Mfp* e *Kat*), classificados filogeneticamente, os oligonucleotídeos foram desenhados a partir das seqüências que apresentaram similaridade com os genes ortólogos exclusivos da via pela análise, e que apresentaram seqüências maiores, para facilitar no desenho do oligonucleotídeo. Foi levado também em consideração a região da proteína a qual a seqüência codifica, preferencialmente a região 3'-UTR do RNA mensageiro, e a utilização de mais de uma seqüência, para se utilizar a região consenso na confecção dos oligonucleotídeos. As seqüências utilizadas no desenho dos oligonucleotídeos específicos estão sinalizadas na Tabela 2.

Todos os oligonucleotídeos específicos amplificaram um único fragmento do tamanho esperado a partir de um *pool* de cDNA das amostras de ápices vegetativos (não mostrado).

Da mesma forma, todos amplificaram fragmentos a partir de DNA genômico sendo que apenas para o gene presumível *acx1* foi verificada presença de um possível íntron, pois o tamanho de fragmento de DNA genômico foi maior do que o cDNA (Figura 9).

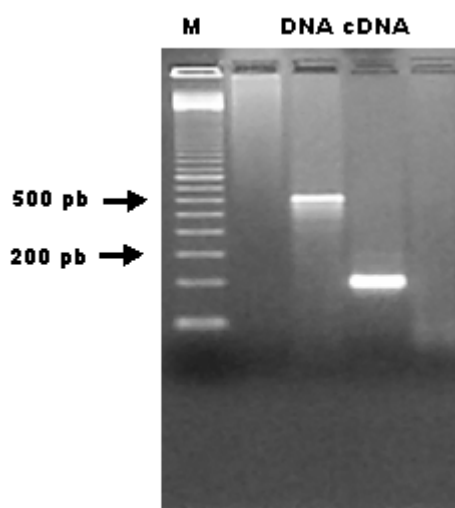


Figura 9 - Gel de agarose 1.0% contendo fragmentos amplificados pelo oligonucleotídeo específico para *Acx1* em DNA genômico e em *pool* de cDNA de ápices vegetativos de *T.cacao*. M: 100 pb (Fermentas).

4.2.1 Desenho e amplificação a partir dos oligonucleotídeos degenerados

A partir das seqüências selecionadas das enzimas LOX 3 e AOS de *Gossypium sp.* e *Arabidopsis*, fez-se uma análise de alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos (Figura 10 e 11). A partir do alinhamento, foram identificadas as regiões nucleotídicas referentes às regiões protéicas mais conservadas e que fornecesse uma região de amplificação relativamente grande para desenho dos oligonucleotídeos degenerados, a fim de se buscar as sequencias dos genes presumíveis *Lox 3* e *Aos* de *T. cacao*.

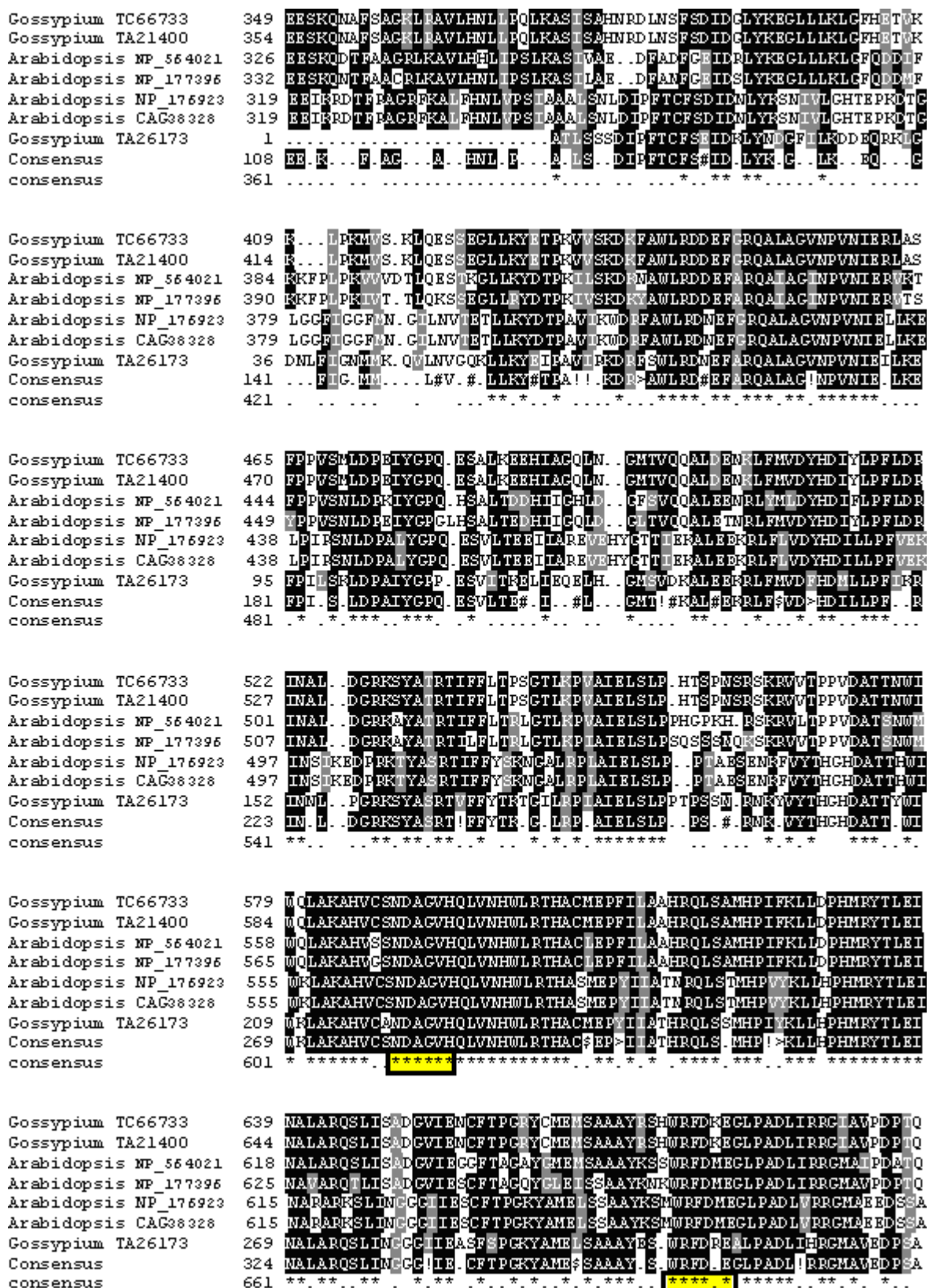


Figura 10 - Alinhamento múltiplo de seqüências da enzima LOX3. Em destaque as regiões onde foram buscadas as seqüências nucleotídicas para desenho dos oligonucleotídeos degenerados.

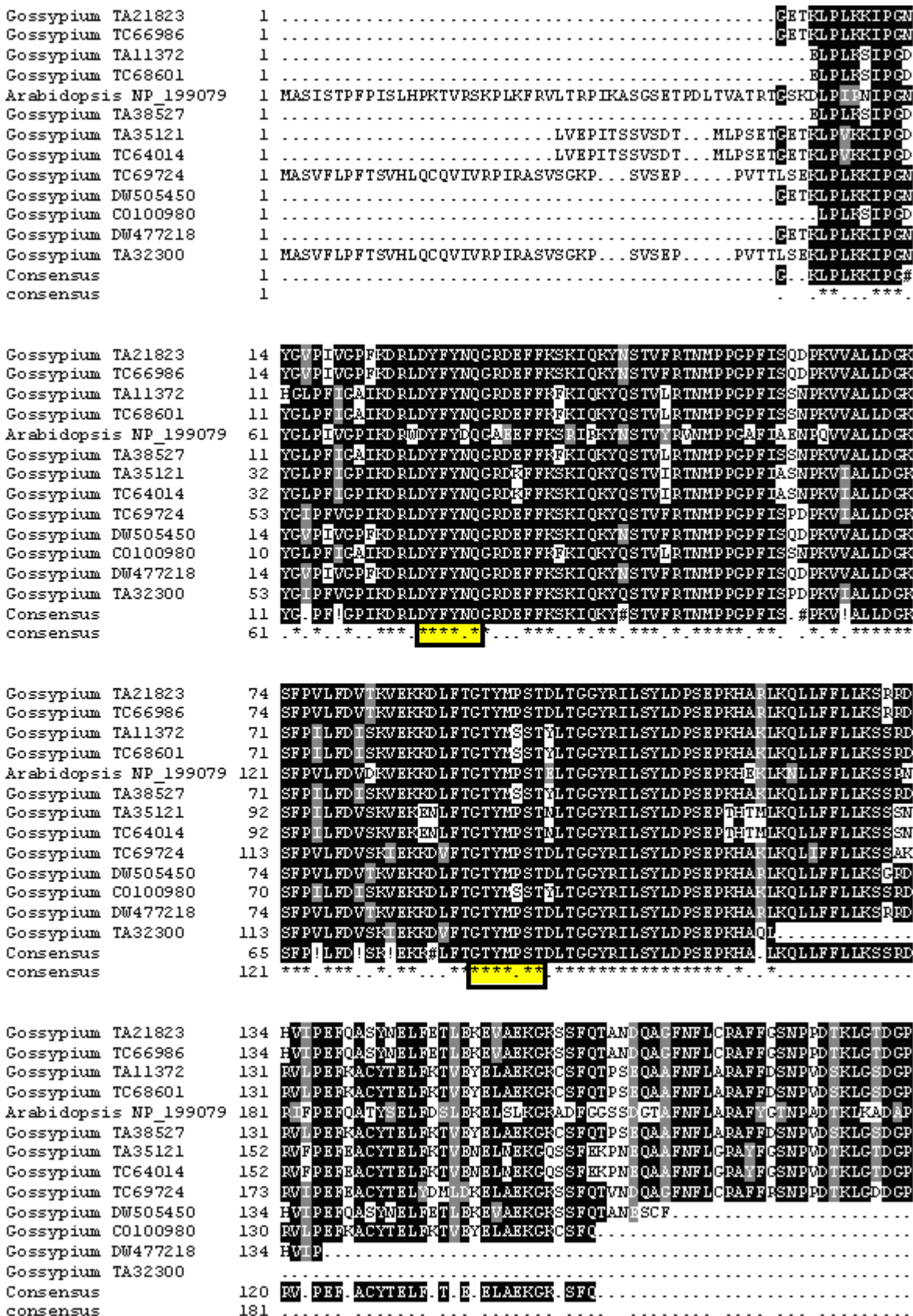


Figura 11 - Alinhamento múltiplo de seqüências da enzima AOS. Em destaque as regiões onde foram buscadas as seqüências nucleotídicas para desenho dos oligonucleotídeos degenerados.

Foram obtidos fragmentos amplificados por PCR a partir de DNA genômico, a uma temperatura de 48°C. O fragmento para *Lox 3* foi bem maior do que esperado, provavelmente devido a presença de íntron no DNA genômico, entre as regiões de consenso escolhidas (Figura 12). Não foi obtida amplificação de fragmentos a partir de cDNA para os dois pares de oligonucleotídeos testados (*Lox3* e *Aos*).

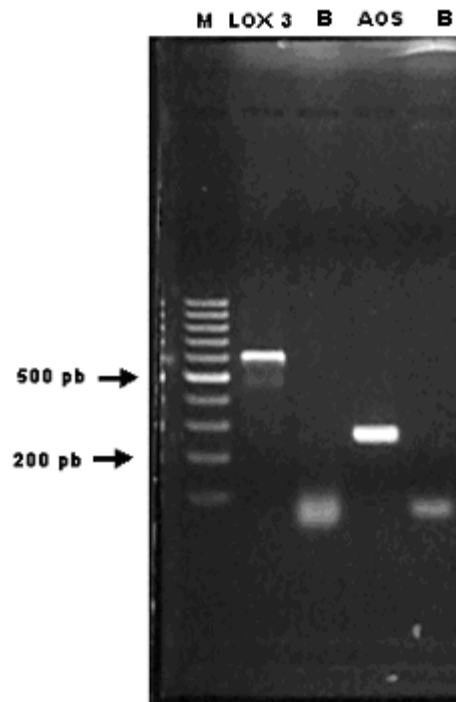


Figura 12 - Gel de agarose 1.0% contendo fragmentos amplificados a partir de DNA genômico pelos oligonucleotídeos degenerados em *T. cacao*. B: Branco, M: 100 pb (Fermentas).

4.2.2 Clonagem, seqüenciamento e identificação dos genes clonados

Os fragmentos de *Lox3* e *Aos* obtidos da amplificação de DNA genômico a partir dos oligonucleotídeos degenerados, e os fragmentos obtidos pela amplificação de cDNA a partir dos oligonucleotídeos específicos relacionados à biossíntese de JA (*Lox2*, *Aoc*, *Opr3*, *Acx*, *Mfp* e *Kat*) foram recortados do gel, purificados e ligados ao vetor de clonagem pGEM-T Easy para posterior seqüenciamento e confirmação da identidade das seqüências. Após a amplificação, clonagem e transformação, foram selecionadas cinco colônias brancas

aleatoriamente para cada gene. Após a confirmação da clonagem dos insertos por PCR de colônia e por digestão com a enzima *EcoRI*, os plasmídeos foram purificados e seqüenciados.

O resultado gerado a partir da ferramenta *Blastx* mostrou que as seqüências obtida a partir da amplificação de DNA genômico usando os oligonucleotídeos degenerados *Lox3* e *Aos* apresentaram satisfatória similaridade com as seqüências dos genes *Lipoxygenase* de *Arabidopsis thaliana* (BAD95111.1) com valor e^{-21} e *Allene Oxide Synthase 2* de *Solanum tuberosum* (ABD15174.1) com valor e^{-24} depositadas no *GeneBank* (Figura 13 e 14).

Novos oligonucleotídeos foram desenhados a partir do seqüenciamento, para os genes *Lox 3* e *Aos*, e estes foram utilizados nas análises de expressão. As seqüências clonadas e seqüenciadas de *Lox2*, *Opr*, *Mfp*, *Acx* e *Kat* apresentaram similaridade com as seqüências desejadas dos genes *Lipoxygenase 2* de *Populus deltoides* (AAZ57445.1) com valor e^{-06} , *12-Oxophytodienoate reductase* de *Hevea brasiliensis* (AAY27752.1) com valor e^{-10} , *MFP2 MULTIFUNCTIONAL PROTEIN* de *Arabidopsis thaliana* (NP_187342.1) com valor e^{-07} , *Acyl-CoA oxidase* de *Glycine max* (AAL01887.1) com valor $e^{0,008}$ e *3-Ketoacyl CoA thiolase* de *Cucumis sativus* (CAA47926.1) com valor e^3 , respectivamente, depositadas no *GeneBank* (Figuras 15, 16, 17, 18 e 19). A análise por *Blastx* da seqüência clonada e sequenciada da putativa *Aoc* não encontrou seqüência com similaridade significativa no *GeneBank*, mas pelo alinhamento desta seqüência, por *ClustalW*, com as seqüências utilizadas no desenho dos oligonucleotídeos identificadas em *T. cacao*, confirmou-se a amplificação específica da seqüência *Aoc*.

```
> dbj|BAD95111.1 putative lipoxygenase [Arabidopsis thaliana]
Length=335

Score = 98.2 bits (243), Expect(2) = 4e-21
Identities = 44/53 (83%), Positives = 51/53 (96%), Gaps = 0/53 (0%)
Frame = +2

Query  287  IIATHRQLSSMHPYKLLHHPMRYTLEINALARQSLVNGGGIIEACXSPGKYA  445
       IIAT+RQLS+MHP+YKLLHHPMRYTLEINA AR+SL+NGGGIIE+C +PGKYA
Sbjct  5     IIATNRQLSTMHPVYKLLHHPMRYTLEINARARKSLINGGGIIESCFTPGKYA  57

Score = 26.2 bits (56), Expect(2) = 4e-21
Identities = 13/19 (68%), Positives = 13/19 (68%), Gaps = 1/19 (5%)
Frame = +1

Query  430  PGKVCXELSSAXYXS-WRF  483
       PGK  ELSSA Y S WRF
Sbjct  53   PGKYAMELSSAAYKSMWRF  71
```

Figura 13 - Resultado do BLASTx entre seqüências obtida de plasmídeo contendo o gene *Lox3*, amplificado por oligonucleotídeo degenerado em *T. cacao*. O resultado indicou similaridade entre as seqüências.

```

> gb|ABD15174.1 allene oxide synthase 2 [Solanum tuberosum]
Length=509

Score = 89.0 bits (219), Expect(2) = 6e-24
Identities = 37/50 (74%), Positives = 46/50 (92%), Gaps = 0/50 (0%)
Frame = +1

Query 1   DYXFDQGRDEFFKSRIQKYQSTVFRFTNMPPGPFIAPNPKVVALLDGKSFP 150
          DY ++QG+DEFF+SR+ KY+ST+FRFTNMPPGPF+ NPKV+ LLDGKSFP
Sbjct 68   DYFYNQ GKDEFFESRVVVKYKSTIFRFTNMPPGPFISSNPKVIVLLDGKSFP 117

Score = 45.1 bits (105), Expect(2) = 6e-24
Identities = 20/21 (95%), Positives = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Frame = +2

Query 155  LFDVVKVEKKDLFTGTYPST 217
          LFDV+KVEKKDLFTGTYPST
Sbjct 119  LFDVSKVEKKDLFTGTYPST 139

```

Figura 14 - Resultado do BLASTx entre seqüências obtida de plasmídeo contendo o gene *Aos*, amplificado por oligonucleotídeo degenerado em *T. cacao*. O resultado indicou similaridade entre as seqüências.

```

> gb|AAZ57445.1 lipoxigenase LOX2 [Populus deltoides]
Length=903

Score = 53.9 bits (128), Expect = 4e-06
Identities = 21/23 (91%), Positives = 23/23 (100%), Gaps = 0/23 (0%)
Frame = -1

Query 69   KAHVLAHDAGYHQLVSHWLRTHC 1
          KAHVLAHD+G+HQLVSHWLRTHC
Sbjct 545  KAHVLAHDSGFHQLVSHWLRTHC 567

```

Figura 15 - Resultado do BLASTx entre seqüências obtida de plasmídeo contendo o gene *Lipoxigenase (Lox2)* de *T. cacao*. O resultado indicou similaridade entre as seqüências.

```

> gb|AAZ27752.1 12-oxophytodienoate reductase [Hevea brasiliensis]
Length=399

Score = 67.8 bits (164), Expect = 3e-10
Identities = 40/47 (85%), Positives = 43/47 (91%), Gaps = 0/47 (0%)
Frame = -1

Query 141  AIGADRVAVRISPAIDHLDATDSNPLNLGLAVIERlnqlqlLLGSKL 1
          AIGADRV R+SPAIDHLDA DS+PLNLGLAVIERLN+LQL LGSKL
Sbjct 230  AIGADRVGFRMSPAIDHLDAIDSDPLNLGLAVIERLNKLQLNLGSKL 276

```

Figura 16 - Resultado do BLASTx entre seqüências obtida de plasmídeo contendo o gene *12-Oxophytodienoate reductase (Opr3)* de *T. cacao*. O resultado indicou similaridade entre as seqüências.

```

> ref|NP\_187342.1| UG MFP2 (MULTIFUNCTIONAL PROTEIN); enoyl-CoA hydratase [Arabidopsis thaliana]
gb|AAF26990.1|AC016827.1 fatty acid multifunctional protein (AtMFP2) [Arabidopsis thaliana]
gb|AAD18042.1| MFP2 [Arabidopsis thaliana]
gb|AAL32699.1| fatty acid multifunctional protein (AtMFP2) [Arabidopsis thaliana]
Length=725

GENE ID: 819870 MFP2 | MFP2 (MULTIFUNCTIONAL PROTEIN); enoyl-CoA hydratase [Arabidopsis thaliana] (10 or fewer PubMed links)

Score = 40.0 bits (92), Expect(2) = 1e-07
Identities = 16/17 (94%), Positives = 17/17 (100%), Gaps = 0/17 (0%)
Frame = -1

Query 127 RGGIMFWADSLGSKYIY 77
          RGGIMFWADS+GSKYIY
Sbjct 668 RGGIMFWADSIGSKYIY 684

Score = 38.9 bits (89), Expect(2) = 1e-07
Identities = 14/20 (70%), Positives = 18/20 (90%), Gaps = 0/20 (0%)
Frame = -2

Query 75  TRLEDWSKMYGEFFKPCAXI 16
          +RL++WSK YGEFFKPCA +
Sbjct 685 SRLDEWSKAYGEFFKPCAPL 704

```

Figura 17 - Resultado do BLASTx entre seqüências obtida de plasmídeo contendo o gene da proteína multifuncional *Mfp* de *T. cacao*. O resultado indicou similaridade entre as seqüências.

```

> gb|AAL01887.1|AF404403.1 G acyl-CoA oxidase [Glycine max]
Length=664

GENE ID: 547625 ACX1;1 | acyl-CoA oxidase [Glycine max]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 43.1 bits (100), Expect = 0.008
Identities = 18/24 (75%), Positives = 20/24 (83%), Gaps = 0/24 (0%)
Frame = -1

Query 72  STAXAIEXCRLKCGGHGYLSSSGV 1
          +TA IE CRKLCGGHGYL SSG+
Sbjct 387 ATADGIEECRKLKCGGHGYLCSSGL 410

```

Figura 18 - Resultado do BLASTx entre seqüências obtida de plasmídeo contendo o gene *Acyl-CoA oxidase (Acx)* de *T. cacao*. O resultado indicou similaridade entre as seqüências.

```

> emb|CAA47926.1| 3-ketoacyl-CoA thiolase; acetyl-CoA acyltransferase [Cucumis sativus]
Length=462

Score = 28.5 bits (62), Expect(2) = 3.0
Identities = 11/11 (100%), Positives = 11/11 (100%), Gaps = 0/11 (0%)
Frame = +1

Query 1   DCRFGVISMCI 33
          DCRFGVISMCI
Sbjct 415 DCRFGVISMCI 425

Score = 25.0 bits (53), Expect(2) = 3.0
Identities = 10/12 (83%), Positives = 10/12 (83%), Gaps = 0/12 (0%)
Frame = +2

Query 59  VFERGDHTDEL 94
          VFERGD DELC
Sbjct 434 VFERGDCVDEL 445

```

Figura 19 - Resultado do BLASTx entre seqüências obtida de plasmídeo contendo o gene *3-Ketoacyl-CoA thiolase (Kat)* de *T. cacao*. O resultado indicou similaridade entre as seqüências.

4.3 Análise da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) em amostras tratadas com indutores ácido salicílico, ethefon e metil-jasmonato

Ácido salicílico (AS), ethefon (ET) e metil-jasmonato (MJ) foram pulverizados nos ápices vegetativos de plantas do acesso susceptível 'P7' e do resistente 'CAB 214' e coletados após 30 min, 1, 2, 4, 6, 24 e 48 h tendo como controle as plantas pulverizadas com água. A partir de ápices vegetativos coletados ao longo do tempo após a aplicação dos indutores, foram obtidos RNA total e transcritos reversos (RT) que foram empregados para análise da expressão diferencial dos oito genes da rota de biossíntese de jasmonato (*Lox2*, *Lox3*, *Aos*, *Aoc*, *Opr3*, *Acx*, *Mfp*, *Kat*), dois genes da rota de biossíntese de etileno (*Samsi*, *Accox*), e os genes *Pal*, *Jaz* e *Della*.

A partir das seqüências identificadas e classificadas dos genes de biossíntese de JA e das seqüências dos demais genes identificados, foram desenhados oligonucleotídeos específicos para análise da expressão gênica por RT-qPCR. Todas as amplificações a partir de cDNA apresentaram na curva de dissociação (*melting*) do RT-qPCR um pico único e consistente de queda de fluorescência (dados não mostrados), o que demonstrou especificidade dos oligonucleotídeos utilizados, confirmada previamente por RT-PCR analisado em gel de agarose, e pela clonagem e seqüenciamento dos produtos de amplificação. Para determinação da eficiência de amplificação e coeficiente R^2 foi utilizado como molde um *pool* de cDNA das amostras coletadas, diluídos serialmente a 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . A eficiência de amplificação foi de aproximadamente 2 para todos os oligonucleotídeos, variando de 0,93 (*Aoc*) a 1,26 (*Della*), com coeficiente R^2 maior que 0,97 (dados não mostrados).

Os genes normalizadores internos (*housekeeping genes*) são genes com expressão constitutiva, que não devem variar nos tecidos ou células sob estudos, ou em resposta à tratamentos ou condições biológicas específicas. Entretanto, muitos estudos fazem uso destes genes normalizadores sem validar sua presumível estabilidade de expressão e tem se verificado cada vez mais na literatura científica que não existem genes normalizadores ideais e universais para todos os tipos de condições (VANDESOMPELE et al., 2002). A normalização a partir de um único gene referência não é geralmente aceitável, a menos que o investigador demonstre claramente evidências que confirmem sua expressão invariável sob as condições experimentais analisadas (BUSTIN et al., 2009). Desta forma, optou-se pelo uso

de quatro genes normalizadores para a análise da expressão gênica relativa, sendo utilizados, portanto, a *Actina*, *Rpl35*, *Gapdh* e *Tubulina*, na análise de uma mesma amostra com o auxílio do programa REST 2008, o qual permite a análise a partir do uso de múltiplos genes normalizadores.

Nas amostras do acesso 'P7' verificou-se uma maior indução da expressão dos genes *Lox2*, *Lox3*, *Aos* e *Aoc*, em relação aos quatro genes normalizadores, nos tempos entre 1 e 4 h (Figura 16), principalmente pelos tratamentos com ethefon (ET) e metil-jasmonato (MJ) comparativamente ao tratamento água, enquanto que no acesso 'CAB 214' estes transcritos responderam um pouco mais cedo aos tratamentos, entre 30 min e 1 h.

O gene *Lox2* apresentou indução significativa de expressão 30 min após aplicação de MJ para ambos os acessos, susceptível 'P7' e resistente 'CAB 214', e seu maior pico de expressão significativa ocorreu após 2 h para o tratamento com ET no 'P7', e com 1 h no 'CAB 214' para ambos os tratamentos, ET e MJ (Figura 20). Em *Arabidopsis*, tratamento com MJ resultou no rápido aumento do nível de transcritos de *Lox2*, com pico máximo de 2 h após aplicação, enquanto que o tratamento com ácido salicílico (AS) promoveu repressão na expressão de transcritos de *Lox2* (BELL; MULLET, 1993). O tratamento dos cacauzeiros com AS promoveu repressão transcricional de *Lox2* após 4 h, sem nenhuma indução de expressão significativa em nenhum dos tempos no acesso 'P7', enquanto que no acesso 'CAB 214' promoveu a repressão no acúmulo de transcritos de *Lox2* com 30 min, porém induziu ao aumento da expressão destes transcritos com 1, 2 e 24 h após a aplicação de AS.

Lox3 também apresentou acúmulo significativo de transcritos com 2 h após o tratamento com ET no acesso 'P7' em relação ao tratamento controle água, e com 1 h no acesso 'CAB 214' (Figura 20). Houve maior indução de *Lox3* nas amostras de 48 h e 2 h após a aplicação de AS nos acessos 'P7' e 'CAB 214', respectivamente. Porém não apresentou indução significativa no tratamento com MJ em ambos os acessos. Em *Pisum sativum*, os genes *Lox* são tecido-específicos e regulados de acordo com o estágio de desenvolvimento dos tecidos (DOMONEY et al., 1990). Para Bell, Creelman e Mullet (1995) provavelmente LOX2 seja a principal LOX envolvida na biossíntese de JA em folhas de *Arabidopsis*, e talvez nos ápices vegetativos de *T. cacao*, a principal isoforma de LOX envolvida na biossíntese de JA também seja a LOX2, pelo fato dos transcritos de *Lox2*, e não os de *Lox3*, responderem ao tratamento com MJ no tecido.

Em relação aos transcritos codificadores de AOS, a enzima-chave da via de biossíntese de JA, foi observado o mais alto nível de indução entre os genes analisados, com cerca de 60 vezes o nível de expressão para o tratamento com aplicação de MJ coletado após

1 h no acesso susceptível 'P7', cujo nível de expressão foi mantido ainda significativo após 2 e 4 h após a aplicação do tratamento (Figura 20). Houve também a indução da expressão de *Aos*, de forma significativa, para o tratamento com ET após 1, 2 e 24 h, e para o tratamento com AS após 4 e 48 h após a aplicação dos indutores no acesso 'P7'. Para o acesso 'CAB 214', os tratamentos com ET e MJ também promoveram o aumento de transcritos de *Aos* de forma significativa, transientemente, após 1 e 24 h, e após o tratamento com AS coletado com 1 h. Componentes de sinalização de vias de defesa, principalmente JA, têm forte efeito positivo na regulação de transcritos *Aos*, enquanto que AS e ET não são tão efetivos na indução transcricional em *Arabidopsis* (AGRAWAL et al., 2002).

No acesso 'P7', a indução na expressão de transcritos *Aoc* foi verificada 30 min após o tratamento com MJ e atingiu valor relativo de expressão de 55 vezes a do controle, 1 h após a aplicação, e a tendência a indução foi mantida até o tempo de 6 h após a aplicação de MJ (Figura 20). Ainda no 'P7', o tratamento com ET também promoveu resposta significativa em transcritos de *Aoc*, porém pela redução na quantidade relativa de transcritos após 30 min, sem indução significativa da expressão. Já o tratamento com AS promoveu o aumento significativo da expressão dos transcritos de *Aoc* somente após 4 h. No acesso 'CAB 214', o tratamento com MJ também levou à indução transcricional de *Aoc* 30 min após a aplicação. Porém o tratamento com AS também induziu a expressão de *Aoc* após 30 min e 1 h. Indução da expressão de transcritos de *Aoc* também foi verificado no tratamento com ET coletados com 1 e 48 h. Em 'CAB 214' nenhum dos tratamentos promoveu a repressão transcricional significativa de *Aoc*, como ocorrido com o tratamento por ET no acesso 'P7'.

Agrawal et al. (2002) verificaram forte indução da expressão dos genes *Aos*, *Aoc* e *Opr3* em *Oryza sativa* 2 h após o tratamento com MJ, e 3 h após a aplicação *Aos* aumentou ainda mais o nível de expressão, enquanto que a transcrição de *Aoc* diminuiu de intensidade. Já no tratamento de arroz com ET, a expressão de *Aoc* e *Opr3* foi induzida fortemente após 2 h, sendo mais fraca a expressão de transcritos *Aos* neste período. Após 3 h do tratamento com ET, *Aos* manteve a mesma fraca expressão, enquanto que *Aoc* demonstrou forte repressão transcricional (AGRAWAL et al., 2002). Stenzel et al. (2003a) também verificaram acúmulo de transcritos de *Aos* e *Aoc* abundantemente 1,5 h após o tratamento com MJ em folhas de *Arabidopsis*, as quais apresentaram indução entre 30 min e 4 h após o tratamento.

O tratamento com AS induziu a expressão de transcritos de *Aos* e *Aoc* em ambos os acessos 'P7' e 'CAB 214'. Em *Arabidopsis*, a expressão de transcritos codificadores para AOS e AOC 30 min e 1 h após a aplicação de AS também foi induzida (STENZEL et al., 2003a). Em relação ao mesmo tratamento em arroz, transcritos de *Aoc* apresentaram forte

expressão após aplicação de AS, enquanto que transcritos de *Aos* apresentaram expressão mais fraca após 2 h, porém após 3 h, houve aumento na transcrição de *Aos* enquanto que de *Aoc* diminuiu (AGRAWAL et al., 2002).

Os genes *Opr3*, *Acx*, *Mfp* e *Kat* apresentaram uma indução significativa de expressão no acesso 'P7', induzida por MJ após 30 min e grande expressão exclusivamente em resposta à MJ após 1 h, exceto para *Acx* (Figura 21). Transcritos de *Acx* e *Mfp* também foram significativamente induzidos por MJ no acesso 'CAB 214' após 30 min do tratamento, enquanto que *Opr3* somente foi induzido em 'CAB 214' após 24 e 48 h da aplicação de MJ. *Mfp* apresentou indução significativa somente à ET e MJ no acesso 'P7', enquanto que no 'CAB 214' além de ET e MJ, o tratamento com AS também induziu a expressão de *Mfp* com 30 min. *Kat* não apresentou aumento significativo na expressão após aplicação de MJ no acesso 'CAB 214', o qual somente foi induzido por ET após 1 e 48 h da aplicação.

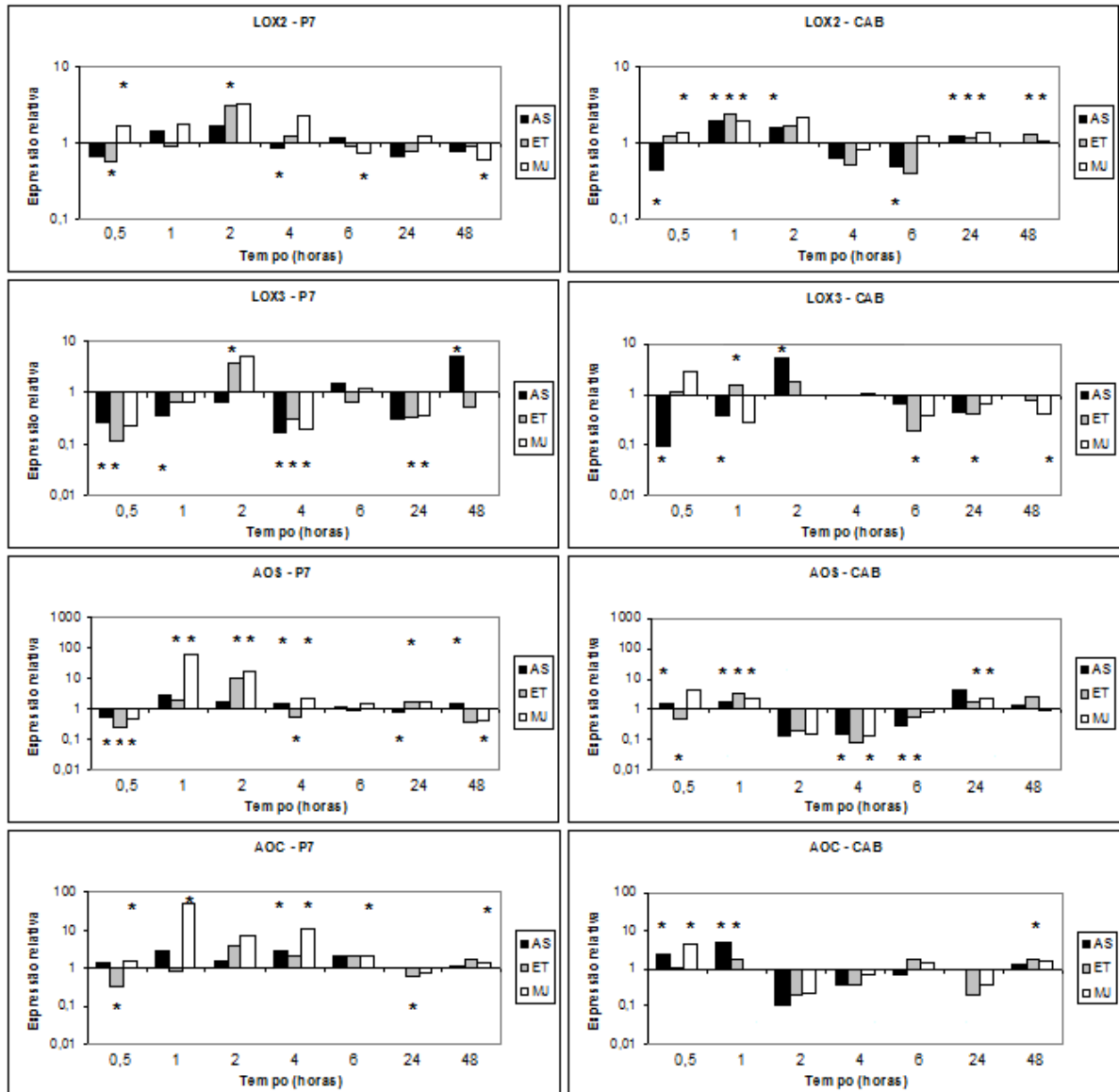


Figura 20 – Análise da expressão dos genes *Lox2*, *Lox3*, *Aos* e *Aoc* de *T. cacao* nos ápices vegetativos dos acessos 'P7' e 'CAB 214', tratados com AS, ET e MJ, tendo como controle o tratamento com água. A expressão relativa dos genes foi calculada pelo programa REST a partir dos valores de Ct determinado por RT-PCR quantitativo em tempo real, tendo como normalizadores os genes da *Actina*, *Rpl35*, *Gapdh* e *Tubulina* de *T. cacao*. A marcação com * indica as amostras que apresentaram significância estatística de acordo com o programa REST.

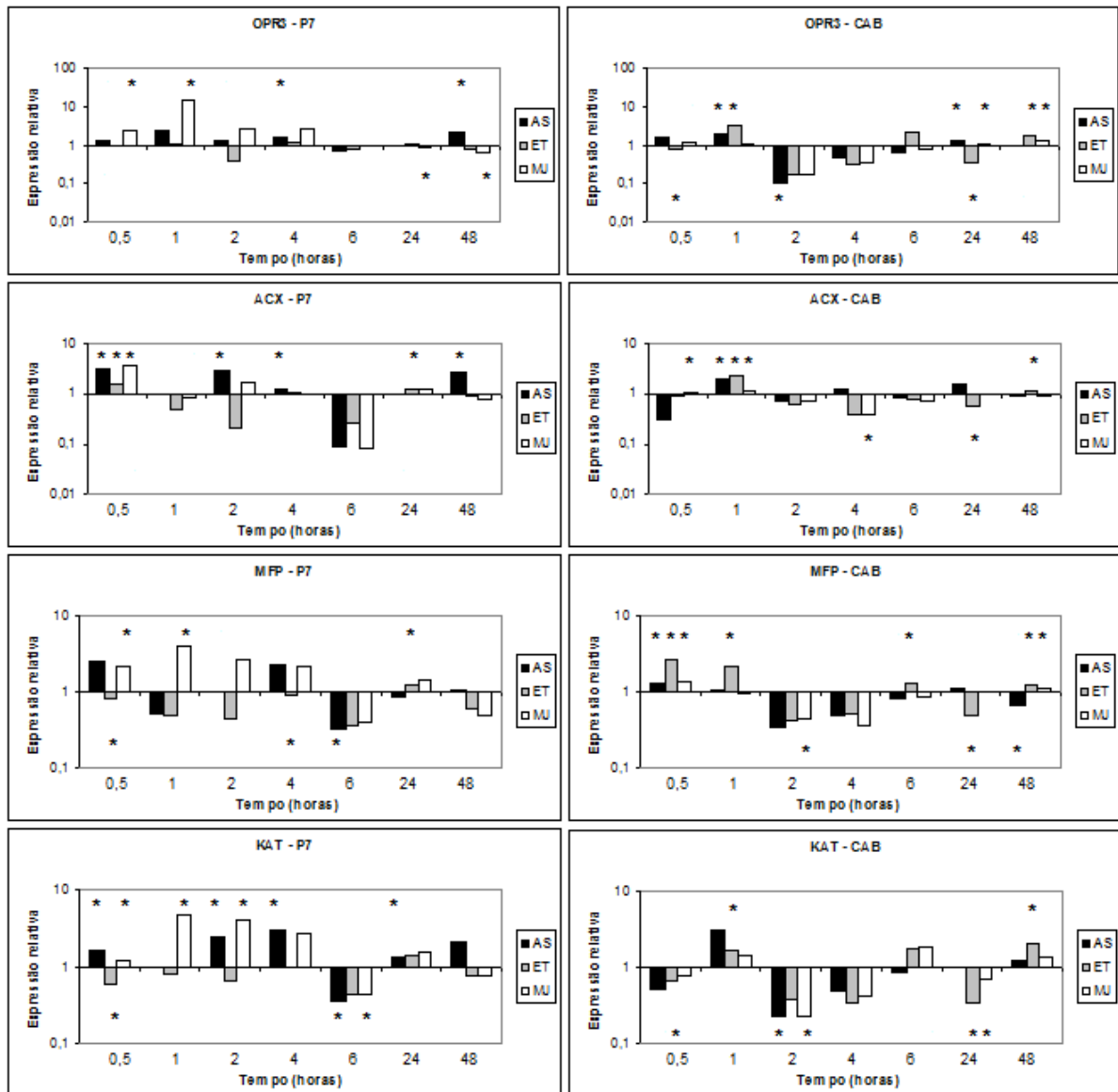


Figura 21 – Análise da expressão dos genes *Opr3*, *Acx*, *Mfp* e *Kat* de *T. cacao* nos ápices vegetativos dos acessos ‘P7’ e ‘CAB 214’, tratados com AS, ET e MJ, tendo como controle o tratamento com água. A expressão relativa dos genes foi calculada pelo programa REST a partir dos valores de Ct determinado por RT-PCR quantitativo em tempo real, tendo como normalizadores os genes da *Actina*, *Rpl35*, *Gapdh* e *Tubulina* de *T. cacao*. A marcação com * indica as amostras que apresentaram significância estatística de acordo com o programa REST.

Todos os genes codificadores das enzimas da via de biossíntese de JA são induzidos por aplicação exógena de metil-jasmonato (MJ) nos mais diversos tecidos (WASTERACK, 2007), e análises de promotores destes genes demonstraram aumento de atividade sob tratamento com MJ em *Arabidopsis* (KUBIGSTELTIG; LAUDERT; WEILER, 1999). Estas evidências sugerem que a biossíntese de JA é regulada por retroalimentação positiva (WASTERACK, 2007). Sob aplicação exógena de MJ, ou sob tratamentos por estresse,

ambos os quais levam ao aumento endógeno de JA, causam o acúmulo rápido, porém transiente de transcritos codificadores de LOX, AOS, AOC e OPR3 em *Arabidopsis* (BELL; MULLET, 1993; SASAKI et al., 2001). Já o AS, devido ao seu antagonismo com ET/MJ, teria efeito repressor nos genes de biossíntese.

Corroborando com estas evidências, Sasaki et al. (2001) realizou análise de macroarranjo de cDNA a fim de examinar o efeito de MJ na regulação da transcrição de 2880 genes em *Arabidopsis*, e indicou que as alterações acontecem principalmente entre 3 e 6 h após o tratamento. A maioria dos genes foi induzida transientemente, sugerindo a presença de mecanismos comuns para a repressão transcricional após a indução. Os dados indicaram também a indução dos transcritos *Lox2*, *Aos*, *Aoc* e *Opr3* após indução por MJ, porém com um perfil de expressão diferente para estes genes, sugerindo que diferentes mecanismos controlam a expressão destes genes.

O mesmo foi aqui observado nos acessos estudados de *T. cacao*, e os resultados sugerem uma diferença de resposta aos tratamentos com indutores entre o acesso susceptível 'P7' e resistente 'CAB 214', onde o 'P7' parece apresentar uma resposta mais intensa (com valores de expressão mais altos), e mais específica dos genes de biossíntese de jasmonato quando tratado com MJ, enquanto que o acesso 'CAB 214' apresenta uma resposta de alguns destes genes com uma intensidade mais baixa, porém com resposta mais precoce (30 min). *Lox2*, *Aos*, *Aoc*, *Opr3*, *Mfp* e *Kat* apresentaram aumento transcricional exclusivo ao tratamento com MJ principalmente após 1 h no acesso 'P7', o que demonstra que o mecanismo de regulação positiva pela aplicação exógena de MJ também ocorre em *T. cacao*.

Sugerem também um *cross-talk* entre as vias de sinalização hormonais, onde se observa efeitos de ácido salicílico na indução transcricional de genes de biossíntese de jasmonato. O tratamento com AS sugeriria a repressão transcricional de enzimas da via de JA, como ocorrido com LOX2 e AOS em *Arabidopsis* (SPOEL et al., 2003). Porém AS e JA podem apresentar expressão sinérgica transiente, enquanto que o antagonismo é característica de alta concentração ou acúmulo prolongado de um ou outro sinal (LAUDERT; WEILER, 2002). Importante notar que estudos onde reportam interações antagônicas após aplicação exógena de AS tendem a usar concentrações acima de 0,5 mM, enquanto que níveis menores como 0,1 mM, ou não demonstram efeito ou exibem efeitos sinérgicos na expressão gênica (THALER; FIDANTSEF; BOSTOCK, 2002; IMANISHI; NAKAKITA, 2000). Assim, na análise dos efeitos de aplicação exógena de AS e JA na expressão gênica é extremamente importante testar diferentes concentrações de cada um dos sinais (MUR et al., 2006).

Em relação aos demais genes de interesse analisados, que não participam da via de biossíntese de JA (*Samsi*, *Accox*, *Pal*, *Jaz* e *Della*), também foram verificadas diferenças no padrão de expressão entre os acessos 'P7' e 'CAB 214' (Figura 22). Os genes participantes da via de biossíntese de etileno, *Samsi* e *Accox* tiveram acúmulo significativo de transcritos após 30 min de aplicação de MJ no acesso 'P7' e com 1 h no 'CAB 214'. O tratamento com ET induziu a expressão significativa de *Samsi* somente após 24 e 48 h no 'P7', enquanto que no acesso 'CAB 214' verificaram-se dois momentos de indução, com 1 e 2 h e com 24 e 48 h. Já *Accox* foi induzido mais tarde no 'P7' em comparação à 'CAB 214', 2 h após tratamento com ET, enquanto que no 'CAB 214' apresentou novamente indução de expressão 1, 2 e 48 h após tratamento. É relatado a indução de transcritos para SAMsi e ACCox, por aplicação exógena de ET (WHITTAKER; SMITH; GARDNER, 1997), sendo a via regulada por retroalimentação positiva. O tratamento com AS não induziu a transcrição de *Samsi* no 'P7', porém induziu no 'CAB 214'; e houve indução de *Accox* no 'P7' após 2 h, e aparente repressão transcricional após 30 min em ambos os acessos.

Ao contrário do esperado, o gene *Pal* foi induzido após 30 min por MJ em ambos os acessos 'P7' e 'CAB 214'. Ishiga et al. (2002) verificaram que MJ inibiu o acúmulo de RNA mensageiro de *Pal* em *Pisum sativum* possivelmente devido a enzima PAL catalizar o primeiro passo da via fenilpropanóide, a qual inclui a produção de ácido salicílico (AS) e fitoalexinas. A inibição de transcritos codificantes de PAL poderia resultar na redução do acúmulo de AS e fitoalexinas. Este resultado seria o consistente com a idéia de que jasmonato age de forma antagônica à via de sinalização por AS (ISHIGA et al., 2003), porém não foi o observado em *T. cacao*.

Em relação aos genes codificadores dos fatores de transcrição, *Jaz* apresentou indução no acesso 'P7' após 30 min e 4 h do tratamento com os três indutores AS, ET e MJ, enquanto que em 'CAB 214', após 1 h de aplicação, todos os três indutores também induziram a expressão de *Jaz*. Após 1 h do tratamento no 'P7', apenas MJ induziu significativamente a expressão diferencial de *Jaz*. Chini et al. (2007) verificaram que JA ativa rapidamente a transcrição de genes codificadores da proteína repressora JAZ, enquanto que facilita a destruição desta a nível protéico. Segundo Kazan e Manners (2008), esta destruição e subsequente re-síntese de proteínas JAZ durante a sinalização por JA, poderia funcionar como controle da via, servindo como retorno ao estado inicial, evitando assim uma resposta contínua e descontrolada. Em relação aos transcritos de *Della*, estes apresentaram 4 vezes mais acúmulo 1 h após aplicação com MJ no acesso 'P7', e houve indução e repressão significativas com ET e MJ, respectivamente, após 30 min. No 'P7' foi também induzida a

expressão de *Della* pelo tratamento com AS após 4, 24 e 48 h. No acesso 'CAB 214' houve indução na expressão de *Della* com aplicação de todos os indutores (AS, ET e MJ) 1 h após tratamento, e apresentou indução e repressão após 30 min com ET e MJ, respectivamente. As proteínas DELLAs foram recentemente implicadas na modulação das respostas do sistema imune de plantas e estas observações são atribuídas em parte, pela alteração no balanço entre a via de sinalização por AS e JA (NAVARRO et al., 2008), sendo observadas alterações na transcrição desse gene pelos três tratamentos em *T. cacao*.

A monitoração da expressão dos genes em cada tratamento com os indutores AS, ET e MJ, demonstrou que a cinética de expressão gênica tem grande variação tanto em relação ao acesso como em função do tempo. Não foi possível visualizar claramente uma especificidade na indução da expressão dos genes de biossíntese de jasmonato exclusivamente pelo tratamento com seu derivado metil-jasmonato como esperado inicialmente, salvo algum determinado tempo específico onde ocorre a indução transcricional somente pelo tratamento com MJ. Foram mais observadas alterações ao longo do tempo e indução significativa pelos três tratamentos. Porém, se observa uma tendência de maior aumento transcricional dos genes relacionados à JA em resposta ao tratamento MJ, quando comparado com o tratamento ET e AS, principalmente para o acesso 'P7'. Nesse caso, a especificidade esperada à MJ pode se caracterizar pela maior intensidade de expressão relativa dos genes de biossíntese de JA em resposta à aplicação de MJ. Assim se observa que os genes *Lox2*, *Lox3*, *Aos*, *Aoc*, *Opr3*, *Mfp* e *Kat* apresentam uma maior tendência a serem induzidos com maior especificidade pelo tratamento com metil-jasmonato, no acesso 'P7', assim como os genes *Pal*, *Jaz* e *Della*, os quais não participam da via de biossíntese de JA, mas de alguma forma estão relacionados à esta via de sinalização. Contudo este mesmo padrão não foi observado no acesso 'CAB 214'.

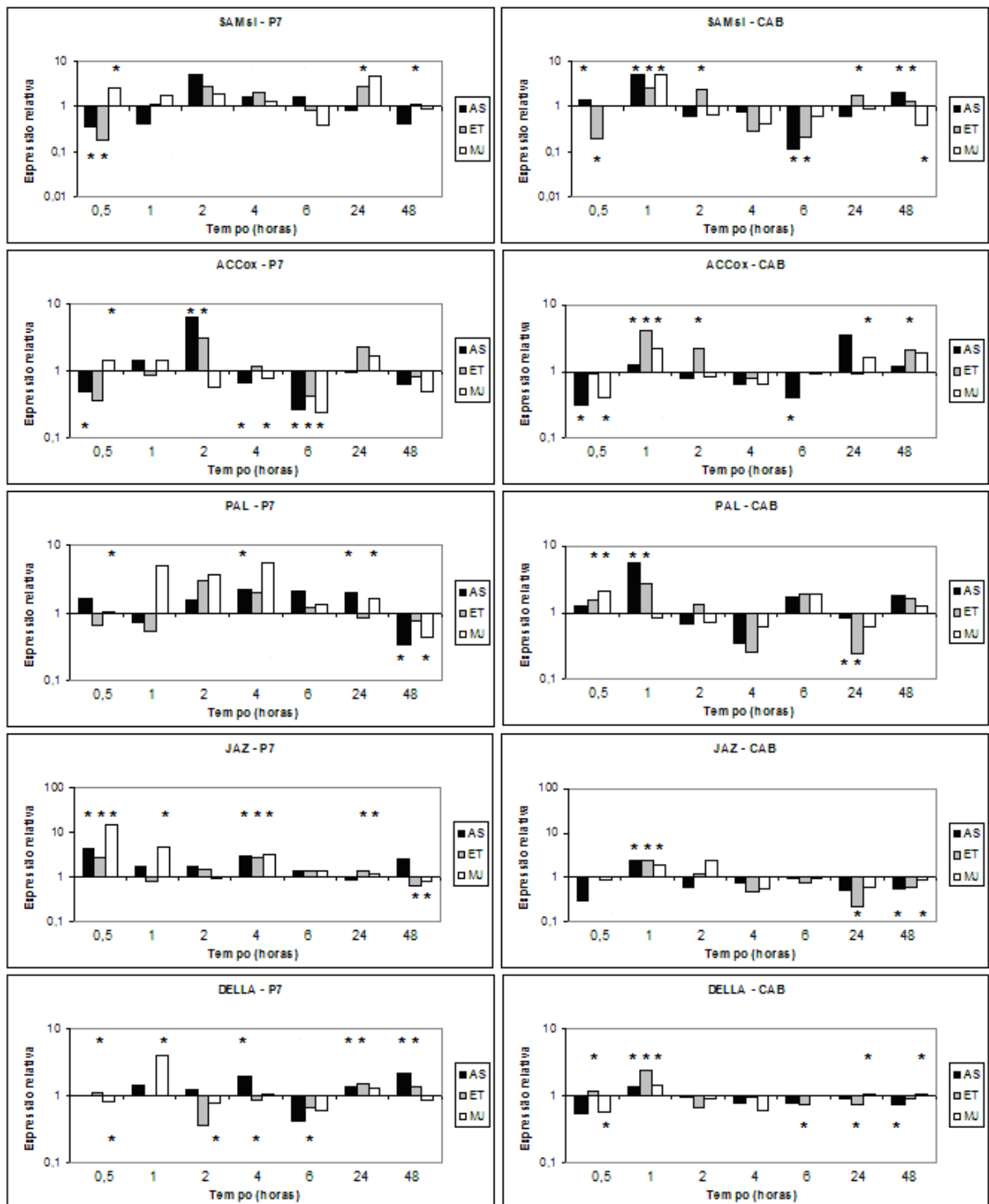


Figura 22 – Análise da expressão dos genes *Samsi*, *Accox*, *Pal*, *Jaz* e *Della* de *T. cacao* nos ápices vegetativos dos acessos 'P7' e 'CAB 214', tratados com AS, ET e MJ, tendo como controle o tratamento com água. A expressão relativa dos genes foi calculada pelo programa REST a partir dos valores de Ct determinado por RT-PCR quantitativo em tempo real, tendo como normalizadores os genes da *Actina*, *Rpl35*, *Gapdh* e *Tubulina* de *T. cacao*. A marcação com * indica as amostras que tiveram significância estatística de acordo com o programa REST.

4.4 Detecção de *M. pernicioso* por transcritos reversos em amostras de ‘P7’ e ‘CAB 214’

A presença do fungo *Moniliophthora pernicioso* em tecidos infectados pode ser detectada por amplificação de transcritos reversos empregando genes específicos, tais como *Actina*, *Rpl35* e outros (LEAL JUNIOR, ALBUQUERQUE, FIGUEIRA, 2007). Nesse estudo, foi conduzida a detecção de transcritos dos genes *Rpl35* e *Aspf13* de *M. pernicioso* em tecidos inoculados ou não, a partir da curva de dissociação do produto amplificado (*melting*) por RT-qPCR específico, tendo como controle positivo o cDNA do fungo cultivado *in vitro*. A temperatura de *melting* para *Rpl35* e *Aspf13* foi em média de 87,6°C e 85,1°C, respectivamente, para todas as amostras analisadas, com pequenas variações. A detecção de transcritos de *Rpl35* de *M. pernicioso* nas amostras inoculadas de ‘P7’ e ‘CAB 214’ foi possível com 6, 24, 48 e 72 h após inoculação (Figura 23), enquanto que os transcritos de *Aspf13* nas amostras de ‘P7’ foi possível a detecção em todos os tempos avaliados (6, 24, 48, 72 e 120 h), e em ‘CAB 214’ foi possível somente nos tempos 6, 48 e 72 h após a inoculação (Figura 24).

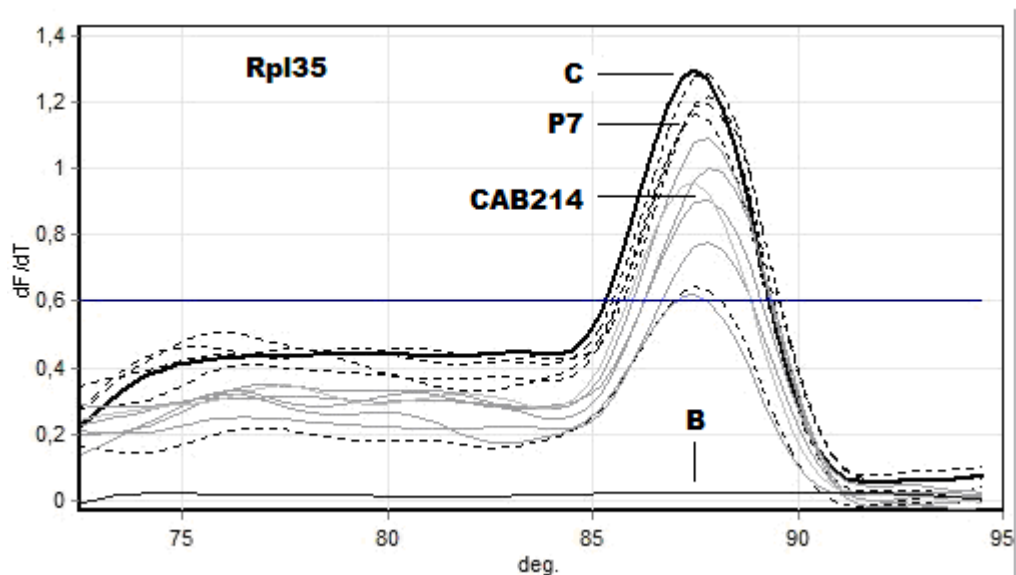


Figura 23 - Curva de dissociação (*melting*) do produto de PCR do gene *Rpl35* de *M. pernicioso* em amostras inoculadas de *T.cacao*, em pontilhado acesso ‘P7’ e cinza ‘CAB 214’. C = controle positivo (cDNA *M. pernicioso* cultivado *in vitro*) e B = controle negativo (sem cDNA).

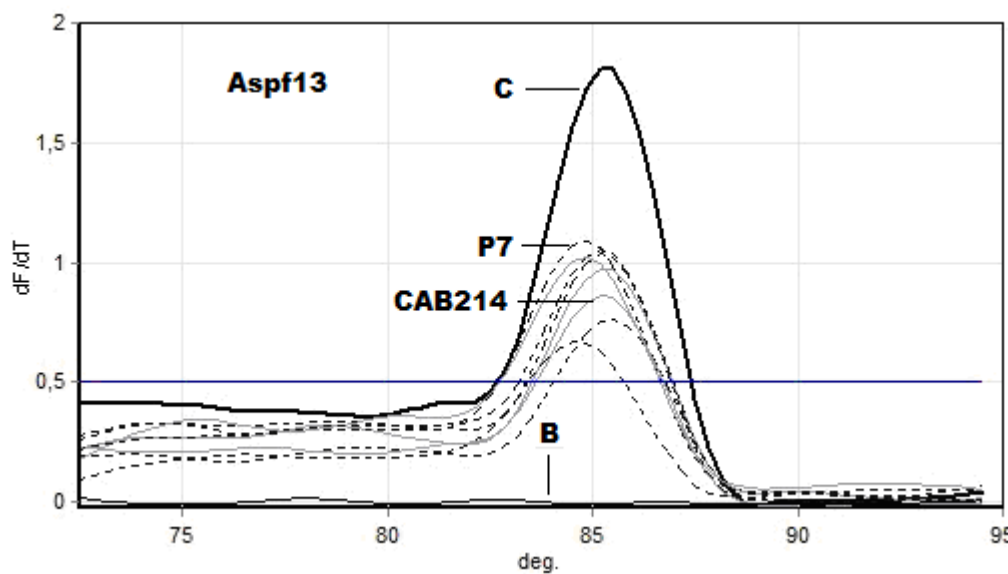


Figura 24 - Curva de dissociação (*melting*) do produto de PCR do gene *AspF13* de *M. pernicioso* em amostras inoculadas de *T.cacao*, em pontilhado acesso 'P7' e cinza 'CAB 214'. C = controle positivo (cDNA *M. pernicioso* cultivado *in vitro*) e B = controle negativo (sem cDNA).

De forma inesperada, houve detecção dos transcritos de ambos os genes também em amostras não inoculadas; porém, pelo menos uma amostra de cada tempo e de cada acesso foi identificada sem detecção de transcritos do fungo, exceto no tempo 72 h, onde todas as replicatas apresentaram transcritos de *M. pernicioso*. Devido às amostras serem oriundas de Marituba, Pará, onde há incidência natural do patógeno, possivelmente estas amostras não inoculadas tiveram contato com esporos de *M. pernicioso* por dispersão pelo ar. As plantas eram mantidas em viveiro aberto, sujeito a essas interferências antes de sua utilização nos experimentos. Dessa forma, após esta avaliação, determinaram-se as amostras inoculadas que demonstraram a presença de transcritos do fungo, enquanto que apenas as amostras não inoculadas e que realmente não apresentavam transcritos foram utilizadas na análise.

4.4.1 Análise da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) em amostras inoculadas com *M. perniciosa*.

A partir de ápices vegetativos dos genótipos ‘P7’ e ‘CAB 214’ coletados com 6, 24, 48, 72 e 120 h após a inoculação com *M. perniciosa* foi realizada análise da expressão dos oito genes de biossíntese de jasmonato (*Lox2*, *Lox3*, *Aos*, *Aoc*, *Opr3*, *Acx*, *Mfp*, *Kat*) e dos demais genes *Samsi*, *Accox*, *Pal*, *Jaz* e *Della*. Foram utilizados quatro genes normalizadores da expressão (*Actina*, *Rpl35*, *Gapdh* e *Tubulina*) e para a análise da expressão gênica relativa se empregou as amostras não inoculadas (isentas de transcritos do patógeno) como controle.

De modo geral, *Lox2* apresentou repressão transcricional significativa na maioria dos tempos analisados no acesso susceptível ‘P7’, 24, 48 e 72 h após a inoculação (Figura 25). Já para o acesso resistente ‘CAB 214’, a expressão de *Lox2* foi significativamente reprimida somente após 48 h. Não houve indução transcricional significativa de *Lox2* após a inoculação em nenhum dos acessos. Em raízes infectadas de *P. sativum* com nematóides, a transcrição de alguns genes *Lox* foi induzida em genótipos resistentes e susceptíveis da planta, com exceção de *Lox2* o qual foi reprimido em ambos os casos (VERONICO et al., 2006). Já os transcritos de *Lox3* em ‘CAB 214’ foram significativamente reprimidos a partir de 6 h até 48 h após a inoculação enquanto que foi induzido significativamente no acesso susceptível ‘P7’ apenas após 120 h da inoculação.

Após 24 h de inoculação, transcritos de *Aos* tiveram um grande acúmulo no acesso resistente ‘CAB 214’, com nível de expressão acima de 11 vezes o controle não inoculado, bem distinto da resposta observada no susceptível ‘P7’, onde somente foi verificada repressão transcricional significativa de *Aos* após 24, 48 e 72 h (Figura 25). Interessante apontar que AOS desempenha um papel chave na biossíntese de jasmonato (JA). Batatas transgênicas super-expressando AOS exibiram elevados níveis endógenos de JA (HARMS, et al., 1995). Em *Oryza sativa*, AOS foi estudada na interação com o patógeno *Magnaporthe grisea*, e indicou que transcritos de *Aos* foram acumulados dentro de 24 h na interação incompatível, o que sugere o possível papel da via LOX na resposta do material resistente do arroz ao patógeno (AGRAWAL, et al., 2002, 2004).

Aoc apresentou tendência à repressão ao longo do tempo analisado em ambos os acessos, com valores mais acentuados de repressão com 24 e 120 h, para os acessos ‘CAB 214’ e ‘P7’, respectivamente (Figura 25). Ishiga et al. (2003) verificaram que a expressão de *Aoc* não foi induzida em *P. sativum* por tratamento ou pela inoculação com um fungo

patogênico compatível. Em relação a *Opr3* e *Acx*, estes também apresentaram tendências de redução no nível dos transcritos durante todos os períodos coletados para ambos os acessos. Porém, houve repressão significativa de *Opr3* no ‘CAB 214’ somente com 24 h, enquanto que no ‘P7’ durante 24, 72 e 120 h. No acesso ‘CAB 214’ houve repressão dos transcritos *Acx* após 48 h e no ‘P7’ após 72 h. Expressão de transcritos de *Aos* e *Opr* foram induzidas com 12 e 24 h após a inoculação de folhas de *P. sativum* com o patógeno virulento *Mycosphaerella pinodes*, porém não houve indução transcricional de *Aoc* até 24 h após a inoculação com este patógeno (ISHIGA et al., 2003). Ressalta-se que a expressão do gene *Actina* mostrou uma tendência a declinar durante a incubação após a inoculação, demonstrando a importância de definir experimentalmente os genes normalizadores mais estáveis em determinada condição analisada, e não utilizar um único gene como referência da expressão relativa (ISHIGA et al., 2003). Os transcritos de *Mfp* apresentaram resposta significativa à inoculação somente no acesso ‘P7’ após 120 h com redução de expressão, sem nenhuma mudança significativa da expressão em ‘CAB 214’. Enquanto que transcritos de *Kat* no ‘P7’ não apresentou mudanças significativas em nenhum dos tempos analisados e houve indução significativa após 6 e 120 h no acesso resistente ‘CAB 214’ (Figura 25).

Em relação aos demais genes analisados, a diferença mais significativa de resposta entre o acesso susceptível e resistente foi observada para o gene *Samsi*, onde após repressão inicial, este apresentou alta expressão com 24 h para o acesso resistente ‘CAB 214’, com nível acima de 10 vezes a do controle não inoculado (Figura 26). Após 48 h, os transcritos de *Samsi* foram reduzidos no acesso susceptível ‘P7’, com leve indução significativa, porém mais tardiamente somente após 120 h da inoculação. SAMsi (SAM sintetase) é a enzima envolvida na síntese de *S-adenosyl-L-methionine* (SAM), que é a molécula precursora da biossíntese de etileno, poliaminas, biotina e nicotiamina, e é a principal molécula doadora de radical metil em plantas (ROEDER et al., 2009). *Accox* participa mais especificamente da via de biossíntese de etileno, pela oxidação do precursor *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid* (ACC) em etileno. *Accox* apresentou aumento na expressão em ambos os acessos, porém com diferença no tempo de indução, após 6 e 24 h no ‘CAB 214’, e após 24 e 120 h no ‘P7’. Em relação aos transcritos de *Pal* somente verificou-se indução no acesso ‘P7’ após 6 h, enquanto que no ‘CAB 214’ foi reprimido após 6 e 48 h da inoculação. O contrário foi observado em relação ao regulador negativo *Jaz*, que apresentou indução transcricional somente no ‘CAB 214’ após 6 h, e repressão no acesso ‘P7’, mas apresentou repressão significativa após 48 e 120 h no ‘CAB 214’. *Della* foi induzida em ambos os acessos, porém apresentou resposta positiva mais cedo, após 6 h no acesso resistente ‘CAB 214’, sendo induzida somente após 48

h no acesso ‘P7’, no qual inicialmente havia apresentado repressão significativa (Figura 26). Navarro et al. (2008) sugerem a participação das proteínas DELLAs na percepção e/ou sinalização de JA, promovendo susceptibilidade à patógenos biotróficos e resistência à necrotróficos. No material resistente ‘CAB 214’ o gene *Della* não é reprimido e é induzido rapidamente em comparação ao susceptível, podendo ter participação no mecanismo de defesa do ‘CAB 214’.

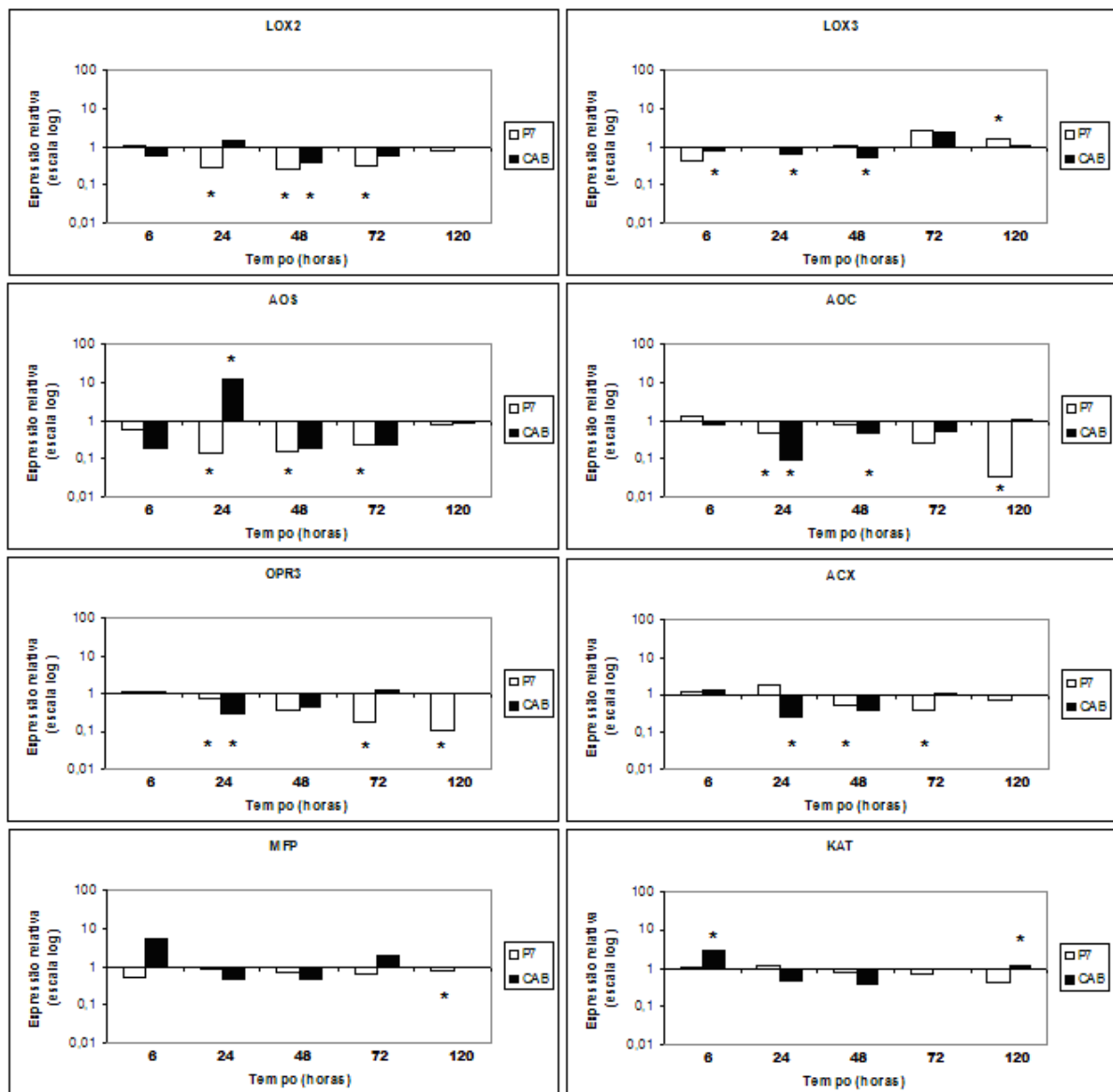


Figura 25 – Análise da expressão dos genes *Lox2*, *Lox3*, *Aos*, *Aoc*, *Opr3*, *Acx*, *Mfp* e *Kat* de *T. cacao* nos ápices vegetativos dos acessos ‘P7’ e ‘CAB 214’ inoculados com *M. perniciosa*, em relação as amostras não-inoculadas. A expressão relativa dos genes foi calculada pelo programa REST a partir dos valores de Ct determinado por RT-PCR quantitativo em tempo real, tendo como normalizadores os genes da *Actina*, *Rpl35*, *Gapdh* e *Tubulina* de *T. cacao*. A marcação com * indica as amostras que tiveram significância estatística de acordo com o programa REST.

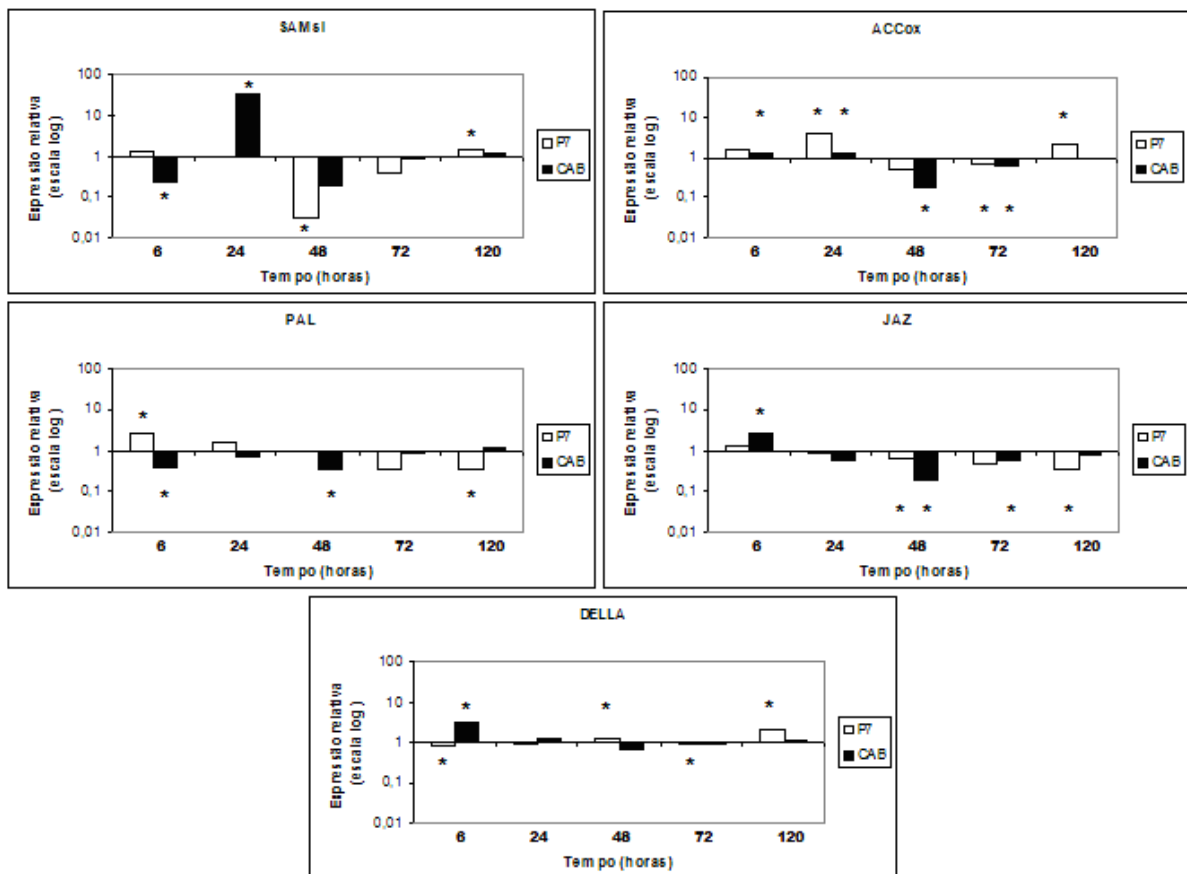


Figura 26 – Análise da expressão dos genes *Samsi*, *Accox*, *Pal*, *Jaz* e *Della* de *T. cacao* nos ápices vegetativos dos acessos ‘P7’ e ‘CAB 214’ inoculados com *M. perniciosa*, em relação as amostras não-inoculadas. A expressão relativa dos genes foi calculada pelo programa REST a partir dos valores de Ct determinado por RT-PCR quantitativo em tempo real, tendo como normalizadores os genes da *Actina*, *Rpl35*, *Gapdh* e *Tubulina* de *T. cacao*. A marcação com * indica as amostras que tiveram significância estatística de acordo com o programa REST.

A análise por RT-qPCR na infecção por *Phymatotrichopsis omnivora* em *Medicago truncatula* corroborou com os dados de expressão por microarranjo, onde foi verificada forte indução da expressão de transcritos *Aos* e *Opr3* com 72 h, e também induziu genes envolvidos na biossíntese de ET com 120 h e fatores de transcrição responsivos a ET, como ERF. Porém nesse caso verificou-se também a expressão de PAL, a partir de 72 h com pico a 120 h (UPPALAPATI et al., 2009).

Os resultados sugerem uma diferença na resposta transcricional dos genes analisados sob inoculação de *M. perniciosa* entre o acesso susceptível ‘P7’ e o resistente ‘CAB 214’ em *T. cacao* 24 h após a inoculação, principalmente com a elevação transcricional significativa de *Aos* no acesso resistente. Veronico et al. (2006) verificaram justamente a ocorrência de

diferentes graus ou mecanismos de regulação transcricional entre genótipos resistentes e susceptíveis na interação entre raízes de *Pisum sativum* e um nematóide. Os genes *Aos*, *Kat*, *Samsi* e *Jaz* apresentaram elevação significativa somente no acesso 'CAB 214' em comparação ao acesso 'P7', assim como uma resposta de indução mais rápida dos genes *Accox* e *Della* no 'CAB 214' em relação ao 'P7'. Os únicos genes que apresentaram indução de transcritos exclusivamente no acesso susceptível 'P7', após a inoculação, foram os genes *Lox3* e *Pal*, sendo reprimido no acesso resistente 'CAB 214'. Transcritos e produtos da via de biossíntese de JA não foram acumulados em cultivares susceptíveis de batata após infecção com o oomiceto hemibiotrófico *Phytophthora infestans* (GÖBEL et al., 2002).

As alterações hormonais observadas em folhas de cacauero infectadas com vassoura-de-bruxa são indicativas de alterações induzidas durante a fase biotrófica de *M. perniciosa* (KILARU; BAILEY; HASENSTEIN, 2007). Plantas com a doença possuem níveis elevados de ácido salicílico (AS) quando comparadas com plantas sadias (CHAVES; GIANFAGNA, 2006), e a tolerância observada em *M. perniciosa* a AS pode ser devido aos genes codificadores de enzimas salicilato hidroxilases, presentes no genoma do fungo (MONDEGO et al., 2008). Foi relatado recentemente que *M. perniciosa* também é capaz de produzir AS, tanto *in vitro* como *in vivo* (CHAVES; GIANFAGNA, 2006) e nesse cenário, a produção de AS pelo patógeno poderia atuar de forma antagônica e bloquear a síntese de JA rendendo assim susceptibilidade da planta à colonização por *M. perniciosa* (KILARU; BAILEY; HASENSTEIN, 2007; CHAVES; GIANFAGNA, 2006). Em materiais resistentes como 'CAB 214', de alguma forma o efeito antagônico de AS não estaria surtindo efeitos, como indicado pelo aumento transcricional de *Aos*, gene codificador da principal enzima envolvida na biossíntese de jasmonato, ou ainda este acesso resistente poderia possuir mecanismos de regulação da via de sinalização de JA diferente do acesso susceptível 'P7', no qual a produção de AS pelo fungo tem efeito negativo em praticamente todos os genes da via de biossíntese de JÁ, inclusive *Aos*. AOS é uma das enzimas chaves da via de sinalização por JA, e apresenta regulação positiva de transcritos durante a resposta a injúria fornecendo um mecanismo de amplificação da via de sinalização por jasmonato (HOWE et al., 2000), e embora os demais genes da via estejam sendo reprimidos no acesso 'CAB 214', muito possivelmente a sinalização da resposta de defesa do acesso resistente 'CAB 214' seja desencadeada por jasmonato, devido ao papel central de AOS na sua rota biossintética. De maneira sinérgica, etileno estaria participando do mecanismo de resposta, pela alta indução de *Samsi* no acesso resistente, embora *Samsi* estaria envolvido em muitas vias metabólicas e aparentemente

nenhuma indução específica destes genes ter sido relatada em plantas sob ataque de patógeno, ou sob estímulos abióticos (BROEKAERT, et al., 2006).

Jasmonato e etileno regulam as respostas de defesa contra um grande número de patógenos necrotróficos e insetos herbívoros, incluindo o fungo *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, a bactéria *Erwinia carotovora* e a expressão de genes de defesa associados à JA e ET é correlacionada com o aumento da expressão de alguns genes codificadores de proteínas antimicrobianas, como tioninas, defensinas PDF1.2, e quitinases básicas (ELLIS; KARAFYLLIDIS; TURNER, 2002), as quais atuam contra o patógeno conferindo resistência à planta. Em bibliotecas de interação de *T.cacao* e *M. perniciosa*, muitos desses genes foram identificados e são induzidos pela via do jasmonato (VERICA et al., 2004), e demonstram indução diferencial em materiais resistentes inoculados (LEAL JUNIOR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007). Aliado a estes fatos, o presente trabalho demonstra a indução de genes das rotas de biossíntese de JA e ET diferencialmente expressos no acesso resistente, o que aumenta as especulações de que a resposta relatada para materiais resistente, como 'CAB 214', pode estar sendo regulada pelos hormônios vegetais JA e/ou ET.

4.5 Quantificação de *M. perniciosa* por transcritos reversos em amostras de 'P7' e 'CAB 214'

A detecção de *Rpl35* e *Aspf13* de *M. perniciosa* em plantas infectadas indica a participação destas proteínas na patogênese de basidiomicetos, podendo a expressão do gene ao longo do tempo ser correlacionado com a colonização pelo fungo (FRIAS; PURDY; SCHMIDT, 1991). A fim de se quantificar a expressão dos genes *Rpl35* e *Aspf13* de *M. perniciosa* durante a interação com *T. cacao*, foi determinada a expressão dos genes do fungo tendo como gene normalizador a *Actina* de *T. cacao*, e como normalizador o tempo de 6 h após a inoculação, pois foi quando os primeiros transcritos do fungo foram detectados (Figura 27).

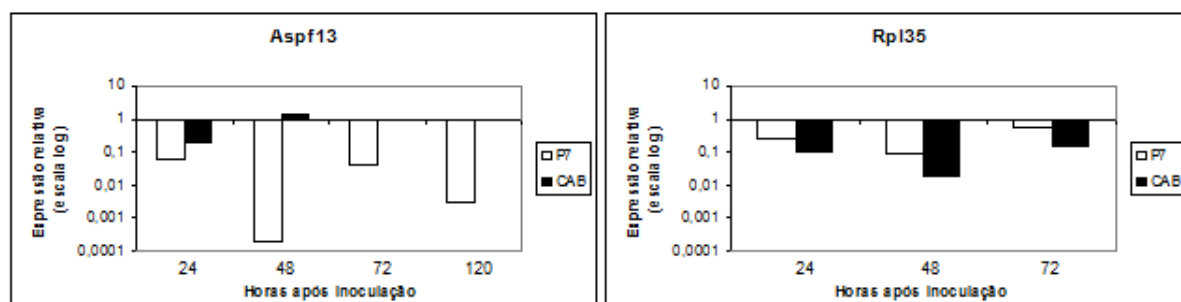


Figura 27 – Análise da expressão dos genes *Aspf13* e *Rpl35* de *M. perniciosa* nas amostras inoculadas de ‘P7’ e ‘CAB 214’. A expressão relativa dos genes foi calculada pelo método $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ a partir dos valores de Ct determinado por RT-qPCR. A análise foi comparada com a amostra de 6 h e a expressão dos genes foi verificada tendo como referência o gene da *Actina* de *T. cacao*.

Aspf13 apresentou redução de transcritos para o acesso ‘P7’ em todos os tempos, enquanto que para o acesso ‘CAB 214’ houve uma redução inicial com 24 h, porém com 48 h o nível voltou a aproximadamente 1, sendo mantido este nível com 72 h e não sendo mais identificado transcritos de *Aspf13* em ‘CAB 214’ com 120 h. *Aspf13* é uma proteína alergênica identificada em *Aspergillus fumigatus*, similar a SnodProt, a qual é uma proteína extracelular secretada pelo fungo *Stagonospora nodorum*, patógeno de trigo (HALL; KEON; HARGREAVES, 1999), e baseado na alta similaridade de seqüências são consideradas como membros da família das *Cerato-platanin* (ZAPAROLI et al., 2009). Zaparoli et al. (2009) identificaram seqüências homologas de *Cerato-platanin* em banco de dados EST de *M. perniciosa* e verificaram uma expressão diferencial destes genes em micélios em fase biotrófica, servindo como elicitores do sistema de defesa da planta. Possivelmente durante a fase biotrófica, o fungo produz pequenas quantidades de substâncias capazes de induzir o sistema de defesa da planta, e assim aumentando o tempo de sobrevivência das vassouras verdes. Nesse caso o que se verificou foi uma forte repressão desse gene no material susceptível em comparação ao resistente, possivelmente com o sistema de defesa da planta não sendo ativado no acesso ‘P7’, permitindo a colonização pelo fungo, enquanto que no material resistente, o sistema de defesa é mais apto no reconhecimento do patógeno e o fungo mantém a expressão do gene.

Em relação a *Rpl35*, este foi reprimido em ambos os acessos, resistente e susceptível, ao longo do tempo, porém com uma repressão mais acentuada para o acesso resistente ‘CAB 214’. Boyce et al. (2002) verificou que ao contrário de genes regulados positivamente durante o crescimento da bactéria patogênica *Pasteurella multocida* em frangos, as proteínas

ribossomais *Rpl34* e *Rpl35* apresentaram baixo nível de expressão durante o crescimento do patógeno dentro do hospedeiro, o que pode ser um indicador de um reduzido raio de crescimento do patógeno. No presente caso, o material resistente apresentou uma maior repressão do gene *Rpl35* de *M. pernicioso* em relação ao 'P7', indicando uma redução na colonização do patógeno em 'CAB 214'. Uma grande redução no acúmulo de transcritos de *Rpl35* foi observado no acesso susceptível 'ICS 39' de *T. cacao*, 72 h depois de inoculação com *M. pernicioso* o que pode ser resultado do efeito da resposta de defesa do cacaueteiro, no metabolismo do patógeno (LEAL JUNIOR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007).

5 CONCLUSÕES

- Foram identificadas seqüências de seis genes presumíveis codificadores das enzimas atuantes na via de biossíntese de jasmonato (JA) em *T. cacao*, e por análise filogenética em comparação aos genes ortólogos de algodão e Arabidopsis, obteve-se as seqüências codificadoras de LOX2, AOC, OPR3, ACX1/5, MFP2 e KAT5.

- Duas outras seqüências, que codificam para as enzimas LOX3 e AOS, não foram encontradas nos bancos de dados de *T. cacao*, e oligonucleotídeos degenerados construídos a partir de regiões consenso de genes ortólogos de algodão e Arabidopsis, possibilitaram a obtenção de seqüências presumíveis destes genes em *T. cacao*.

- As seqüências dos genes de biossíntese de JA foram induzidas transientemente principalmente em resposta à aplicação de metil-jasmonato (0,12mM) entre 1 e 6 h no acesso 'P7', e no acesso 'CAB 214' foram induzidos mais precocemente e com menor intensidade. Indução de expressão significativas também foi observada após a aplicação de ácido salicílico (7,25mM) e ethefon (0,1mM) até 120 h em ambos os acessos.

- Diferenças na resposta transcricional dos genes analisados sob inoculação de *M. perniciosa* entre o acesso susceptível 'P7' e o resistente 'CAB 214' foram observadas. Os genes *Aos*, *Kat*, *Samsi* e *Jaz* apresentaram elevação significativa somente no acesso 'CAB 214' em comparação ao acesso 'P7', sugerindo que a sinalização da resposta de defesa do acesso resistente 'CAB 214' esteja sendo desencadeada por jasmonato e/ou etileno.

- A utilização dos genes específicos de *Moniliophthora perniciosa* *Rpl35* e *Aspf13* permitiram detectar, por amplificação de transcritos reversos, a presença do fungo em tecidos infectados e não infectados, o que foi determinante na escolha das amostras a serem analisadas na análise de expressão gênica quantitativa.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, G. K.; RANDEEP, R.; NAM-SOO, J.; KEON-SEON, H.; AGRAWAL, V. P. Molecular cloning and mRNA expression analysis of the first rice jasmonate biosynthetic pathway gene allene oxide synthase. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 771-782, 2002.
- AGRAWAL, G. K.; TAMOGAMIC, S.; HAND, O.; IWAHASHIE, H.; RAKWAL, R. Rice octadecanoid pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 317, p. 1-15, 2004.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1997.
- AIME, M. C., PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, Lancaster, v. 97, p. 1012-1022, 2005.
- ALBUQUERQUE, P. S. B. **Mapas de ligação e controladores de características quantitativas (QTL) associadas à resistência a *Crinipellis pernicioso* em acessos de cacau (*Theobroma cacao*) originários da Amazônia brasileira**. 2006. 133 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- ALBUQUERQUE, P. S. B.; MOTA, J. W. S.; ANDEBRHAN, T. Poda fitossanitária na recuperação de rocas de cacau (*Theobroma cacao*) com alta incidência de vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) em Rondônia: aspectos técnicos e econômicos. **Agrotropica**, Itabuna, v. 7, p. 43-48, 1995.
- ALDRIDGE, D. C.; GALT, S.; GILES, D.; TURNER, W. B. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. **Journal of Chemical Society, C**, London, p. 1623-1627, 1971.
- ANDEBRHAN, T.; de ALMEIDA, L. C.; NAKAIAMA, L. H. I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicioso* (STAHEL) Singer: a experiência da Amazônia brasileira. **Agrotropica**, Itabuna, v. 10, p. 49-60, 1999.
- BAE, H.; KIM, M. S.; SICHER, R. C.; BAE, H-J.; BAILEY, B. A. Necrosis- and ethylene-inducing peptide from *Fusarium oxysporum* induces a complex cascade of transcripts associated with signal transduction and cell death in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, p. 1056-1067, 2006.
- BAILEY, B. A.; STREM, M. D.; BAE, H.; MAYOLO, G. A.; GUILTINAN, M. J. Gene expression in leaves of *Theobroma cacao* in response to mechanical wounding, ethylene, and/or methyl jasmonato. **Plant Science**, Amsterdam, v. 168, p. 1247-1258, 2005.
- BAKER, R. E. D.; HOLIDAY, P. **Witches' broom disease of cocoa (*Marasmius perniciosus* Stahel)**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1957. 42 p. (Phytopathological Paper, 2).

BARI, R.; JONES, J. D. G. Role of plant hormones in plant defense responses. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, p. 473-488, 2009.

BARTLEY, B. G. D. Cacao, *Theobroma cacao*. **FAO Plant Production and Protection Paper**, Rome, v. 70, p. 25-42, 1986.

BASTOS, C. N. Avaliação de fungicidas sistêmicos no controle da vassoura-de-bruxa do cacauero. **Agrotropica**, Itabuna, v. 1, p. 128-132, 1989.

BELL, E.; CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 92, p. 8675-79, 1995.

BELL, E.; MULLET, J. E. Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, p. 1133-1137, 1993.

BOWERS, J. H.; BAILEY, B. A.; HEBBAR, P. K.; SANOGO, S.; LUMSDEN, R. D. The impact of plant diseases on world chocolate production. **Plant Health Progress**, 2001. DOI 10.1094/PHP-2001-0709-01-RV. Disponível em: <http://www.apsnet.org/online/feature/cacao/> Acesso em: maio de 2009.

BOYCE, J. D.; WILKIE, I.; HARPER, M.; PAUSTIAN, M. L.; KAPUR, V.; ADLER, B. Genomic scale analysis of *Pasteurella multocida* gene expression during growth within the natural chicken host. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 70, n. 12, p. 6871-6879, 2002.

BRODERSEN, P.; PETERSEN, M.; BJORN NIELSEN, H.; ZHU, S.; NEWMAN, M. A.; SHOKAT, K. M.; RIETZ, S.; PARKER, J.; MUNDY, J. *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. **Plant Journal**, Oxford, v. 47, p. 532-546, 2006.

BROEKAERT, W. F.; DELAURE, S. L.; de BOLLE, M. F. C.; CAMMUE, B. P. A. The Role of Ethylene in Host-Pathogen Interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 393-416, 2006.

BROWN, J. S.; SCHNELL, R. J.; MOTAMAYOR, J. C.; LOPES, U.; 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. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Geneva, v. 130, p. 366-373, 2005.

BROWNLEE, H. E.; HEDGER, J. N.; SCOTT, I. M. Effect of a range of procyanidins on the cocoa pathogens *Crinipellis pernicioso*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 40, p. 227-232, 1992.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CASTILLO, M. C.; MARTINEZ, C.; BUCHALA, A.; METRAUX, J. P.; LEON, J. Gene-Specific Involvement of β -Oxidation in Wound-Activated Responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, p. 85-94, 2004.

CHAVES, F. C.; GIANFAGNA, T. J. Necrotrophic phase of *Moniliophthora perniciosa* causes salicylic acid accumulation in infected stems of cacao. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 69, p. 104-108, 2006.

CHINI, A. et al. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signaling. **Nature**, London, v. 448, p. 666-671, 2007.

COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L.; BASTOS, C. N. Progress in biological control of witches' broom in Bahia, Brazil. **International Permanent Working Group for Cocoa Pests and Diseases Newsletter**, Yamoussoukro, Cote d'Ivoire, n. 2, p. 6, 1998.

CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 355-381, 1997.

CUI, J.; BAHRAMI, A. K.; PRINGLE, E. G.; HERNANDEZ-GUZMAN, G.; BENDER, C. L.; PIERCE, N. E.; AUSUBEL, F. M. *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 102, p. 1791-1796, 2005.

DOMONEY, C.; FIRMIN, J. L.; SIDEBOTTOM, C.; EALING, P. M.; SLABAS, A.; CASEY, R. Lipoxygenase heterogeneity in *Pisum sativum*. **Planta**, Berlin, v. 181, p. 35-43, 1990.

DELGADO, J. C.; COOK, A. A. Nuclear condition of the basidia basidiospore and mycelial of *Marasmius pernicius*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 54, p. 66-72, 1976.

DELKER, C.; ZOLMAN, B. K.; MIERSCH, O.; WASTERACK, C. Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* requires peroxisomal β -oxidation enzymes – Additional proof by properties of pex6 and aim1. **Phytochemistry**, Oxford, v. 68, p. 1642-1650, 2007.

DEVOTO, A.; TURNER, J. G. Jasmonate-regulated *Arabidopsis* stress signalling network. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 123, p. 161-172, 2005.

ELLIS, C.; KARAFYLLIDIS, I.; TURNER, J. G. Constitutive activation of jasmonate signaling in an *Arabidopsis* mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St.Paul, v. 15, n. 10, p. 1025-1030, 2002.

EVANS, H. C. Witches' Broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*) in Ecuador: 1. The fungus. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 89, p. 185-192, 1978.

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

FAN, J.; HILL, L.; CROOKS, C.; DOERNER, P.; LAMB, C. Abscisic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. **Plant Physiology**, Rockville, 2009. DOI 10.1104/pp.109.137943. Disponível em: <http://www.plantphysiol.org/cgi/rapidpdf/pp.109.137943v1>. Acesso em: 20 de junho de 2009.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution: International Journal of Organic Evolution**, Lawrence, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FERREIRA, R. B.; MONTEIRO, S. Fungal Pathogens: The Battle for Plant Infection. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 25, p. 505-524, 2006.

FEYS, B. J.; PARKER, J. E. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 16, p. 449-455, 2000.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 9, p. 275-296, 1971.

FONSECA, S. E. A. Avaliação de resistência a *Crinipellis pernicioso* em novos clones de *Theobroma cacao*. **Agrotropica**, Itabuna, v. 2, p. 137-143, 1990.

FONSECA, S. E. A.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Avaliação de clones de cacau na Amazônia brasileira em relação a incidência de vassoura-de-bruxa. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12., 2000, Salvador, Bahia. **Proceedings...** Lagos, Nigeria: Cocoa Producers' Alliance, 2000. 1 CD-ROM.

FRIAS, G. A.; PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Infection biology of *Crinipellis pernicioso* on vegetative flushes of cacao. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, p. 552-556, 1991.

GACHOMO, E.; SHONUKAN, O.; KOTCHONI, S. The molecular initiation and subsequent acquisition of disease resistance in plants. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 2, p. 26-32, 2003.

GARCIA, O.; MACEDO, J. A. N.; TIBÚRCIO, R.; ZAPAROLI, G.; RINCONES, J.; BITTENCOURT, L. M. C.; CEITA, G. O.; MICHELI, F.; GESTEIRA, A.; MARIANO, A. C.; SCHIAVINATO, M. A.; MEDRANO, F. J.; MEINHARDT, L. W.; PEREIRA, G. A. G.; CASCARDO, J. C. M. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, n. 4, p. 443-455, 2007.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanism of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 205-207, 2005.

GÖBEL, C.; FEUSSNER, I.; HAMBERG, M.; ROSAHL, S. Oxylin profiling in pathogen-infected potato leaves. **Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1584, n. 1, p. 55-64, 2002.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cacao, *Crinipellis pernicioso*. **Heredity**, London, v. 71, p. 278-289, 1994.

HALITSCHKE, R.; BALDWIN, I. T. Jasmonates and related compounds in plant-insect interactions. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 23, n. 3, p. 238-245, 2004.

HALL, N.; KEON, J. P. R.; HARGREAVES, J. A. A homologue of a gene implicated in the virulence of human fungal diseases is present in a plant fungal pathogen and is expressed during infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 69-73, 1999.

HARMS, K.; ATZORN, R.; BRASH, A.; KÜHN, H.; WASTERNAK, C.; WILLMITZER, L.; PEIIA-CORTÉS, H. Expression of a flax allene oxide synthase cDNA leads to increased endogenous jasmonic acid (JA) levels in transgenic potato plants but not to a corresponding activation of JA-responding genes. **Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 1645-1654, 1995.

HAUSE, B.; MROSK, C.; ISAYENKOV, S.; STRACK, D. Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. **Phytochemistry**, Oxford, v. 68, p. 101-110, 2007.

HEITZ, T.; BERGEY, D. R.; RYAN, C. A. A gene encoding a chloroplast- targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, p. 1085–1093, 1996.

HOWE, G. A.; LEE, G. I.; ITOH, A.; LI, L.; de ROCHER, A. E. Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato: cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, p. 711–724, 2000.

ICCO. Cocoa year 2008/09. **Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics**, London, v. 35, n. 1, 2009. Disponível em: (http://www.icco.org/statistics/statistics%20PDFs/Production_QBCS%20XXXV%20No2.pdf). Acesso em: 20 de julho de 2009.

IMANISHI, S.; NAKAKITA, M. Aspirin and salicylic acid do not inhibit methyl jasmonate-inducible expression of a gene for ornithine decarboxylase in tobacco BY-2 cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Beijing, v. 64, p. 125-133, 2000.

ISHIGA, Y.; FUNATO, A.; TACHIKI, T.; TOYODA, K.; SHIRAIISHI, T.; YAMADA, T.; ICHINOSE, Y. Expression of the 12-oxophytodienoic acid 10, 11-reductase gene in the compatible interaction between pea and fungal pathogen. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 43, p. 1210–1220, 2002.

ISHIGA, Y.; INAGAKI, Y.; TOYODA, K.; SHIRAIISHI, T.; ICHINOSE, Y. Expression of allene oxide synthase and allene oxide cyclase in the interactions between pea and fungal pathogens. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 69, p. 351-357, 2003.

JONES, J. D.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, London, v. 444, p. 323-329, 2006.

KAZAN, K.; MANNERS, J. M. Jasmonate Signaling: toward an integrated view. **Plant Physiology**, Rockville, v. 146, p. 1459-1468, 2008.

KEEN, N. T. Plant disease resistance: Progress in basic understanding and practical application. **Advances in Botanical Research**, St. Louis, v. 30, p. 292-328, 1999.

KILARU A.; BAILEY, B. A.; HASENSTEIN, K. H. *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 274, p. 238-244, 2007.

KUBIGSTELTIG, I.; LAUDERT, D.; WEILER, E. W. Structure and regulation of the *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase gene. **Planta**, Berlin, v. 208, p. 463-471, 1999.

LAKER, H. A.; SREENIVASAN, T. N.; KUMAR D. R. Present status of witches' broom disease of cocoa in Trinidad. **Tropical Pest Management**, London, v. 34, p. 318-323, 1988.

LAUDERT, D.; WEILER, E. W. Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signaling. **Plant Journal**, Oxford, v. 15, p. 675-684, 2002.

LAWRENCE, J. S.; CAMPÊLO, A. M. F. L.; FIGUEIREDO, J. M. Enfermidades do cacauzeiro. II. Doenças fúngicas que ocorrem nas folhas, ramos e tronco. **Agrotropica**, Itabuna, v. 3, p. 1-14, 1991.

LEAL JUNIOR, G. A. **Avaliação da expressão de genes de *T. cacao* e *C. perniciosa* associados a resistência e patogenicidade no período assintomático da doença Vassoura-de-Bruxa**. 2006. 124 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

LEAL JUNIOR., G. A.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; FIGUEIRA, A. Genes differentially expressed in *Theobroma cacao* associated with resistance to witches' broom disease caused by *Crinipellis perniciosa*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 279-292, 2007.

LI, J.; BRADER, G.; PALVA, E. T. The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. **Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. 319-331, 2004.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, Amsterdam, v. 25, p. 402-408, 2001.

LORENZO, O.; PIQUERAS, R.; SANCHEZ-SERRANO, J. J.; SOLANO, R. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defence. **Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 165-178, 2003.

LORENZO, O.; SOLANO, R. Molecular players regulating the jasmonate signaling network. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, p. 532-540, 2005.

MCDOWELL, J. M.; DANGL, J. L. Signal transduction in the plant immune response. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 25, p. 79-82, 2000.

MAUCHER, H.; HAUSE, B.; FEUSSNER, I.; ZIEGLER, J.; WASTERACK, C. Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seedling development. **Plant Journal**, Oxford, v. 21, p. 199-213, 2000.

MATSUI, H.; NAKAMURA, G.; ISHIGA, Y.; TOSHIMA, H.; INAGAKI, Y.; TOYODA, K.; SHIRAIISHI, T.; ICHINOSE, Y. Structure and expression of 12-oxophytodienoate

reductase (subgroup I) genes in pea, and characterization of the oxidoreductase activities of their recombinant products. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 271, p. 1-10, 2004.

MEJÍA, L. C.; ROJAS, E.; MAYNARD, Z.; VAN BAELE, S.; ARNOLD, A. E.; HEBBAR, P.; SAMUELS, G. J.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 4-14, 2008.

MONDEGO, J. M. C.; CARAZZOLLE, M. F.; COSTA, G. G.; FORMIGHIERI, E. F.; PARIZZI, L. P.; RINCONES, J.; COTOMACCI, C.; CARRARO, D. M.; CUNHA, A. F.; CARRER, H.; VIDAL, R. O.; ESTRELA, R. C.; GARCÍA, O.; THOMAZELLA, D. P.; OLIVEIRA, B. V.; PIRES, A. B.; RIO, M. C.; ARAÚJO, M. R.; MORAES, M. H.; CASTRO, L. A.; GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, M. S.; NETO, J. P.; NETO, A. G.; BARBOSA, L. V.; GUILTINAN, M. J.; BAILEY, B. A.; MEINHARDT, L. W.; CASCARDO, J. C.; PEREIRA, G. A. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. **BMC Genomics**, London, v. 9, p. 548, 2008.

MONTESINOS, E. Plant-associated microorganisms: a view from the scope of microbiology. **International Microbiology**, Madrid, v. 6, p. 221-223, 2003.

MONTESINOS, E.; BONATERRA, A.; BADOSA, E.; FRANCÉS J.; ALEMANY, J.; LLORENTE, I.; MORAGREGA, C. Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. **International Microbiology**, Madrid, v. 5, p. 169-175, 2002.

MUR, L. A. J.; KENTON, P.; ATZORN, R.; MIERSCH, O.; WASTERACK, C.. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 249-262, 2006.

NAVARRO, L.; BARI, R.; ACHARD, P.; LISÓN, P.; NEMRI, A.; HARBERD, N. P.; JONES, J. D. G. DELLAs Control Plant Immune Responses by Modulating the Balance of Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling. **Current Biology**, London, v. 18, p. 650-655, 2008.

NDAMUKONG, I.; ABDALLAT, A. A.; THUROW, C.; FODE B.; ZANDER M.; WEIGEL, R.; GATZ C. SA-inducible *Arabidopsis* glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. **Plant Journal**, Oxford, v. 50, p. 128-139, 2007.

PAGE, R. D. M. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 357-358, 1996.

OVERMYER, K.; BROSCHE, M.; KANGASJÄRVI, J. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. **Trends in Plant Sciences**, Amsterdam, v. 8, p. 335-342, 2003.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative Expression Software Tool (REST) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 30, n. 9, p. e36, 2002.

PENG, Y. L.; SHIRANO, Y.; OHTA, H.; HIBINO, T.; TANAKA, K.; SHIBATA, D. A novel lipoxygenase from rice: primary structure and specific expression upon incompatible infection with rice blast fungus. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, p. 3755–3761, 1994.

PEREIRA, J. L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. M.; ALMEIDA, L. C. C. First record on the presence of witches' broom disease in the principal cocoa-producing area of Brazil. **Turrialba**, Turrialba, v. 39, p. 459-461, 1989.

POUND, F. J. Cacao and witches' broom disease (*Marasmius perniciosus*) of South America. In: TOXOPEUS H. (ed.) **Reprint archives of cocoa research**. American Cocoa Research Institute, 1938. v. 1. 44p.

POZO, M. J.; LOON, L. C. V.; PIETERSE, C. M. J. Jasmonates—signals in plant—microbe interactions. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 23, p. 211–222, 2005.

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

QUEIRÓZ, V. T.; GUIMARÃES, C. T.; AHNERT, D.; SCHUSTER, I.; DAHER, R. T.; PEREIRA, M. G.; MIRANDA, V. R. M.; LOGUÉRCIO, L. L.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. **Plant Breeding**, Berlin, v. 122, p. 268-272, 2003.

ROBERT-SEILANIANTZ, A.; NAVARRO, L.; BARI, R.; JONES, J. D. G. Pathological hormone imbalances. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 10, p. 372-379, 2007.

ROEDER, S.; DRESCHLER, K.; WIRTZ, M.; CRISTESCU, S. M.; VAN HARREN, F. J.; HELL, R.; PIECHULLA, B. SAM levels, gene expression of SAM synthetase, methionine synthase and ACC oxidase, and ethylene emission from *N. suaveolens* flowers. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 70, p. 535-546, 2009.

ROJO, E.; SOLANO, R.; SÁNCHEZ-SERRANO, J. J. Interactions Between Signaling Compounds Involved in Plant Defense. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 22, p. 82-98, 2003.

ROYO, J.; VANCANNEYT, G.; PEREZ, A. G.; SANZ, C.; STORMANNI, K.; ROSAHL, S.; SERRANO, J. S. Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, n. 35, p. 21012-21019, 1996.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 132, p. 365-86, 2000.

SASAKI, Y.; ASAMIZU, E.; SHIBATA, D.; NAKAMURA, Y.; KANEKO, T.; AWAI, K.; AMAGAI, M.; KUWATA, C.; TSUGANE, T.; MASUDA, T.; SHIMADA, H.;

TAKAMIYA, K.-I.; OHTA, H.; TABATA, S. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. **DNA Research**, Oxford, v. 8, p. 153-161, 2001.

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

SCHALLER, F.; ZERBER, P.; REINBOTHER, S.; REINBOTHER, C.; HOFMANN, E.; POLLMANN, S. The allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana* – localization and cyclization. **FEBS Journal**, Oxford, v. 275, p. 2428-2441, 2008.

SCHILLMILLER, A. L.; HOWE, G. A. Systemic signaling in the wound response. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, p. 369-377, 2005.

SCHILLMILLER, A. L.; KOO, A. J. K.; HOWE, G. A. Functional diversification of Acyl-Coenzyme A Oxidases in jasmonic acid biosynthesis and action. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, p. 812-824, 2007.

SILVA, C. R. S. **Caracterização de seqüências gênicas expressas (EST) durante o desenvolvimento de sementes de *Theobroma cacao* L. com ênfase na biossíntese de ácidos graxos e triglicerídeos.** 2005. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

SILVA, F. C. O.; NETO, E. F.; KODAMA, K. R.; FIGUEIRA, A. Avaliação das relações genéticas entre genótipos de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) contrastantes para reação à vassoura-de-bruxa através de marcadores RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, p. 205, 1998.

SILVA, S. D. V. M.; LUZ, E. D. M. N.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Crinipellis pernicioso* em cacaueteiros suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 54-59, 1999.

SPOEL, S. H.; KOORNNEEF, A.; CLAESSENS, S. M. C.; KORZELIUS, J. P.; VAN PELT, J. A.; MUELLER, M. J.; BUCHALA, A. J.; MÉTRAUX, J.-P.; BROWN, R.; KAZAN, K.; VAN LOON, L. C.; DONG, X.; PIETERSE, C. M. J. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. **Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 760-770, 2003.

SPOEL S. H.; JOHNSON J. S.; DONG, X. Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 104, p. 18842-18847, 2007.

STANLEY, D. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 51, p. 25-44, 2006.

STASWICK, P. E. JAZing up jasmonate signaling. **Trends in Plant Sciences**, Amsterdam, v. 13, p. 66-71, 2008.

STENZEL, I.; HAUSE, B.; MAUCHER, H.; PITZSCHKE, A.; MIERSCH, O.; ZIEGLER, J.; RYAN, C.; WASTERACK, C. Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato – amplification in wound signaling. **Plant Journal**, Oxford, v. 33, p. 577–589, 2003a.

STENZEL, I.; HAUSE, B.; MIERSCH, O.; KURZ, T.; MAUCHER, H.; WEICHERT, H.; ZIEGLER, J.; FEUSSNER, I.; WASTERACK, C. Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 51, p. 895-911, 2003b.

SUN, T. P.; GLUBER, F. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 197-223, 2004.

SURUJDEO-MAHARAJ, S.; UMAHARAN, P.; BUTLER, D. R.; SREENIVASAN, T. N. An optimized screening method for identifying levels of resistance to *Crinipellis perniciosa* in cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology**, London, v. 52, p. 464-475, 2003.

SUZUKI, H.; XIA, Y.; CAMERON, R.; SHADLE, G.; BLOUNT, J.; LAMB, C.; DIXON, R. A. Signals for local and systemic responses of plants to pathogen attack. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 169-179, 2004.

SWOFFORD, D. L. **PAUP***: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) 4.0 Beta. Sunderland: Sinauer Associates, 1998.

THALER, J. S.; FIDANTSEF, A. L.; BOSTOCK, R. M. Antagonism between jasmonate- and salicylate-mediated induced plant resistance: effects of concentration and timing of elicitation on defense-related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 28, p. 1131-1159, 2002.

THINES, B.; KATSIR, L.; MELOTTO, M.; NIU, Y.; MANDAOKAR, A.; LIU, G.; NOMURA, K.; HE, S. Y.; HOWE, G. A.; BROWSE, J. JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COII} complex during jasmonate signaling. **Nature**, London, v. 448, p. 661-665, 2007.

TON, J.; MAUCH-MANI, B. Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. **Plant Journal**, Oxford, v. 38, p. 119-130, 2004.

UPPALAPATI, S. R.; MAREK, S. M.; LEE, H.-K.; NAKASHIMA, J.; TANG, Y.; SLEDGE, M. K.; DIXON, R. A.; MYSORE, K. S. Global gene expression profiling during *Medicago truncatula*-*Phymatotrichopsis omnivore* interaction reveals a role for jasmonic acid, ethylene, and the flavonoid pathway in disease development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 22, n. 1, p. 7-17, 2009.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, reserach0034-1-34-11, 2002.

VERICA, J. A.; MAXIMOVA, S. N.; STREM, M. D.; CARLSON, J. E.; BAILEY, B. A.; GUILTINAN, M. J. Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. **Plant Cell Reports**, New York, v. 23, p. 404–413, 2004.

VERONICO, P.; GIANNINO, D.; MELILLO, M. T.; LEONE, A.; REYES, A.; KENNEDY, M. W.; BLEVE-ZACHEO, T. A novel lipoxygenase in pea roots. Its function in wounding and biotic stress. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, p. 1045-1055, 2006.

VIJAYAN, P.; SHOCKEY, J.; LEVESQUE, C. A.; COOK, R. J.; BROWSE, J. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 95, p. 7209–7214, 1998.

VÖRÖS, K.; FEUSSNER, I.; KÜHN, H.; LEE, J.; GRANER, A.; LIBLER, M.; PARTHIER, B.; WASTERACK, C. Characterization of methyljasmonate-inducible lipoxygenase from barley (*Hordeum vulgare* cv.Salome) leaves. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 51, p. 36–44, 1998.

WASTERACK, C.; HAUSE, B. Jasmonates and octadecanoids—signals in plant stress response and development. In: MOLDAVE, K. (Ed.). **Progress in nucleic acid research and molecular biology**. New York: Academic Press, 2002. p. 165–221.

WASTERACK, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, p. 681-697, 2007.

XU, Y.; CHANG, P. F.; LIU, D.; NARASIMHAN, M. L.; RAGHOTHAMA, K. G.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Plant defense genes are synergically induced by ethylene and methyl jasmonate. **Plant Cell**, Baltimore, v. 6, p. 1077-1085, 1994.

WHITTAKER, D. J.; SMITH, G. S.; GARDNER, R. C. Expression of ethylene biosynthetic genes in *Actinidia chinensis* fruit. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 34, p. 45-55, 1997.

ZAPAROLI, G.; CABRERA, O. G.; MEDRANO, F. J.; TIBURCIO, R.; LACERDA, G.; PEREIRA, G. G. Identification of a second family of genes in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease in cacao, encoding necrosis-inducing proteins similar to cerato-platanins. **Mycological Research**, Cambridge, v. 113, p. 61-72, 2009.

APÊNDICES

Apêndice A - Sequências dos genes de *T. cacao* e identificação da região protéica a qual estas sequências traduzem. As sequências com as mesmas letras iniciais representam aquelas que possuem sobreposição de regiões da proteína, as quais as sequências traduzem.

SEQÜÊNCIAS	AMINOÁCIDOS	
	Nº INÍCIO	Nº FIM
LOX		
A - CA798101	175	251
A - CA794714	197	418
B - KZOAAT1YJ11RM1	415	674
B - KZOABB14YF22FM1	501	744
C - CF973956	693	821
C - KZOABB11YE08FM1	729	899
C - KZOABB7YM24FM1	800	894
AOC		
A - CF9738751	115	251
A - CL144Contig1	138	251
A - KZ0AAV4YJ08FM1	140	251
A - KZ0AAC2YD09FM1	150	251
OPR		
A - CA798318	11	118
B - CF972770.1	208	329
B - CF974195.1	215	395
B - iBINT-RT-001-047	220	378
B - iBINT-RT-001-027-F06	233	393
B - CF974179.1	251	395
B - CF974065.1	251	395
B - CF974183.1	253	395
B - TC212	253	395
B - KZ0ABE10YM04FM1	275	395
B - KZ0ACL2YM05FM1	346	395
ACX		
A - KZOABF8YN04FM1	296	490
A - KZOABF9YN04FM1	315	425
B - CF973580	424	517
B - TC424	429	517
B - TA1131	429	517
B - KZOACAA1YF16FM1	474	561
MFP		
A - KZ0AAA10YO13FM1	14	258
B - KZ0ABB12YI05FM1	562	725
B - KZ0ABB14YF15FM1	581	725
MFP		
B - CL96Contig1	604	725
KAT		
A - CL108Contig1	183	449
A - iBIEM-NT-001-020-B04	263	461
A - KZOAAT7YD06FM1	335	462
A - KZ0AAS2YC24FM1	348	461
A - KZ0AAT10YB24FM1	348	461
A - CL65Contig1	355	461
A - KZ0ABA3YA03FM1	377	461

Apêndice B - Enzimas atuantes na via de biossíntese de jasmonato e suas classificações em *Arabidopsis thaliana*.

Enzimas da biossíntese do jasmonato	Enzimas de <i>Arabidopsis</i> (nº acesso GenBank)	Especificidade com a via
<i>Lipoxygenase</i>	LOX 1 (NP_175900); LOX 2 (NP_566875); LOX 3 (NP_176923)	LOX 2 LOX 3 (ROYO et al., 1996)
<i>Allene Oxide Synthase</i>	AOS (NP_199079)	AOS (KUBIGSTELTIG; LAUDERT; WEILER, 1999)
<i>Allene Oxide Cyclase</i>	AOC 1 (NP_189204); AOC 2 (NP_566776); AOC 3 (NP_566777); AOC 4 (NP_172786)	AOC 1 AOC 2 AOC 3 AOC 4 (SCHALLER et.al., 2008)
<i>12-oxophytodienoate reductase</i>	OPR 1 (NP_177794); OPR 2 (NP_177795); OPR 3 (NP_178662)	OPR 3 (MATSUI et al., 2004)
<i>Acyl-CoA oxidase</i>	ACX 1 (NP_567513); ACX 2 (NP_201316); ACX 3 (NP_172119); ACX 4 (NP_190752); ACX 5 (NP_181112); ACX 6 (NP_172120)	ACX 1 ACX 5 (SCHILMILLER; KOO; HOWE, 2007)
<i>3-keto-acyl-CoA thiolase</i>	KAT 1 (NP_171965); KAT 2 (NP_180873); KAT 5 (NP_568704)	KAT 2 KAT 5 (CASTILLO et.al., 2004)
Proteína multifuncional	AIM 1 (NP_194630); MFP 2 (NP_187342)	MFP 2 AIM 1 (DELKER et al., 2007)

Apêndice C – Oligonucleotídeos utilizados para os genes normalizadores da expressão relativa em *Theobroma cacao* e para os genes de *Momiliophthora perniciosa* (MP). F: *Foward*, R: *Reverse*.

Gene	Oligonucleotídeos
<i>Actina</i>	F: TCCTCTTCCAGCCATCTCTC R: TCTCCTTGCTCATTCGGTCT
<i>Rpl35</i>	F: GTCACTCCGGCTAACATCGT R: GAAAACCCACAAGGCTTCAG
<i>Gapdh</i>	F: GATGCTCCTATGTTTGTTGTGG R: TCTTCCTCCTCTCCAGTCCTT
<i>Tubulina B</i>	F: ATTCCCCCGTCTTCACTTCT R: TCTGCTCATCAACCTCTTTGG
MP_ <i>Rpl35</i>	F: ACTTCGGGTGCAAAGATTG R: TGGTCCTTCTTCGTCTGCTT
MP_ <i>Aspf13</i>	F: TTCACAACGATTCCCAACCT R: TTACAAGCCGCAGACAGAAC