

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



**ANÁLISE BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE PROTEASES NA
INTERAÇÃO *Theobroma cacao* - *Moniliophthora perniciosa***

HELIANA ARGÔLO SANTOS CARVALHO

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Março de 2007

HELIANA ARGÔLO SANTOS CARVALHO

ANÁLISE BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE PROTEASES NA INTERAÇÃO
Theobroma cacao-Moniliophthora perniciosa

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

HELIANA ARGÔLO SANTOS CARVALHO

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Março de 2007

HELIANA ARGÔLO SANTOS CARVALHO

ANÁLISE BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE PROTEASES NA INTERAÇÃO
Theobroma cacao-Moniliophthora perniciosa

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

APROVADA: 14 de março de 2007

Prof. Dr. Júlio César de
Mattos Cascardo

UESC

Prof. Dr. Luis Cesar
Paulillo

UEFS

Dra. Karina Peres
Gramacho

CEPLAC

Dra. Fabienne Micheli
Cirad/UESC - Orientadora

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Hélio Bento dos Santos e Ana Lúcia Argôlo Santos, pelo amor, carinho e incentivo, dedico.

Ao meu esposo Stênio Carvalho Santos e o meu filho, Stênio Carvalho Santos Filho, ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu força, otimismo, serenidade e determinação para perseverar diante das dificuldades e para cumprir esta jornada.

A Dr^a Fabienne Micheli, pela orientação, confiança, presteza e apoio na realização deste trabalho.

A CAPES pela concessão da minha bolsa de estudo.

À Coordenação e Secretaria do Mestrado em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz, pelo apoio e incentivo.

Ao Co-orientador Abelmon Gesteira, ao Conselheiro Márcio Costa e ao Colaborador Júlio Cascardo, pela ajuda prestada.

Ao professor Carlos Priminho Pirovani pela amizade, disposição e grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

A Dr^a Karina Gramacho pela boa vontade em ceder o espaço do Laboratório de Fitopatologia do CEPEC/CEPLAC.

A todos os professores do programa, pela competência no exercício da docência e dedicação ao programa de mestrado.

A todos os funcionários da Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu esposo e colega de trabalho Stênio Carvalho pela paciência, carinho e ajuda nos momentos mais complicados dessa jornada.

A minha amiga Dayane, que muito colaborou nos trabalhos de bancada.

Aos meus queridos amigos Cristiano e Braz, pela constante ajuda, disponibilidade em todos os momentos em que precisei e pela grande amizade.

Aos colegas do Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Genômica e Expressão Gênica, em especial, Maíza, Jeiza, Claudine, Dahyana, Pelé, Vanderli, pelo apoio, amizade e companheirismo.

Ao pessoal da iniciação científica em especial à Daniele, Thaise, Adilma e André, pelo carinho.

A todos os meus colegas do Mestrado em Genética e Biologia Molecular da UESC, especialmente Fabiana, Vânia e Carlos Eduardo, pelo convívio e amizade.

A toda a minha família (pais, esposo, filho, irmãos, sobrinhos, sogro e sogra, cunhados, tios e primos) e amigos, pelo amor, carinho e apoio constante.

ÍNDICE

EXTRATO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. A cacauicultura	3
2.2. A doença vassoura-de-bruxa	4
2.3. Enzimas proteolíticas / proteases: definição e classificação.....	9
2.3.1. Definição	9
2.3.2. Classificação das proteases.....	10
2.4. Funções das proteases.....	16
2.4.1. Envolvimento das proteases na morte celular programada e na defesa de plantas	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Re-sequenciamento dos clones.....	22
3.2. Análise de seqüências gênicas.....	22
3.3. Desenho de <i>primers</i> específicos para a análise da expressão gênica ...	23
3.4. Material vegetal	24
3.5. Extração do RNA total de meristemas de <i>Theobroma cacao</i>	25
3.6. Teste para a escolha das melhores condições dos PCRs.....	26

3.7. Análise de expressão gênica por meio de sqRT-PCR (<i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>)	28
3.8. Cultivo de <i>Moniliophthora perniciosa</i>	29
3.9. Extração de proteínas fungicas totais	30
3.10. Extração de proteínas totais de <i>Theobroma cacao</i>	30
3.11. Eletroforese SDS-PAGE	31
3.12. Gel de atividade proteolítica	31
4. RESULTADOS	33
4.1. Análise de seqüências de proteases de <i>Theobroma cacao</i>	33
4.2. Análise preliminar ao estudo da expressão gênica por meio de RT-PCR de proteases de <i>Theobroma cacao</i>	41
4.2.1. Teste de especificidade dos <i>primers</i> entre classes de proteases .41	
4.2.2. Teste de especificidade dos <i>primers</i> entre genes da mesma classe de proteases	42
4.3. Análise da expressão gênica de proteases de <i>Theobroma cacao</i> em meristema infectado por <i>Moniliophthora perniciosa</i>	43
4.4. Estudo da atividade de proteases de <i>Theobroma cacao</i>	45
4.4.1. Extração de proteínas totais.....	45
4.4.2. Detecção da atividade proteolítica em gel de SDS-nativo.....	47
5. DISCUSSÃO	51
5.1. <i>Theobroma cacao</i> codifica proteases de pertencem a pelo menos três distintas classes	51
5.2. Diferentes classes de proteases apresentam expressão diferencial em <i>Theobroma cacao</i> durante a infecção por <i>Moniliophthora perniciosa</i> .53	
5.3. Atividade proteolítica é detectada em <i>Theobroma cacao</i> em diferentes condições e fases da doença vassoura-de-bruxa	56
6. CONCLUSÃO.....	59
7.PERSPECTIVAS.....	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

EXTRATO

CARVALHO, Heliana Argôlo Santos, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - BA, março de 2007. **Análise bioquímica e molecular de proteases na interação *Theobroma cacao*-*Moniliophthora perniciosa***

Orientadora: Fabienne F. L. Micheli. Co-orientador: Abelmon da Silva Gesteira. Conselheiro: Márcio Gilberto Cardoso Costa. Colaborador: Júlio César de Mattos Cascardo.

A cacauicultura no sul da Bahia sofreu prejuízos econômicos de grande escala devido à propagação da vassoura-de-bruxa, doença causada pelo fungo *Moniliophthora* (= *Crinipellis*) *perniciosa* (Stahel) Singer. Grave crise se instalou na região com as perdas de produtividade, associadas aos baixos preços do produto no mercado internacional, contribuindo para a descapitalização dos agricultores e o abandono das lavouras. *M. perniciosa* é um fungo hemibiotrófico que provoca vários sintomas no cacaueteiro tendo como maior característica o super brotamento, conhecido como vassoura-de-bruxa. Apesar de muitos esforços no sentido de desenvolver estratégias para conter ou reduzir esses danos, a doença continua avançando. Um maior conhecimento sobre a interação *T. cacao*-*M. perniciosa* ao nível molecular se faz necessário para o estudo dos possíveis mecanismos de resistência/susceptibilidade envolvidos nesta interação e para melhor compreensão e utilização correta de metodologias que possam vir a conter os danos causados pelo *M. perniciosa*.

A análise do processo de necrose nos tecidos do cacau durante a infecção pelo *M. pernicioso* mostrou que essa interação envolve um processo de morte celular programada (PCD, *Programmed Cell Death*) e indicadores celulares característicos dessa PCD, como a degradação do DNA, foi identificada (CEITA et al., publicação aceita em *Plant Science*). Estudos moleculares realizados no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UESC, demonstraram a presença de genes de diferentes classes de proteases em bibliotecas de cDNA das interações resistentes e suscetíveis no patossistema *T. cacao-M. pernicioso*. Na literatura, essas enzimas estão relacionadas com a PCD nas interações compatíveis ou com uma reação de hipersensibilidade (HR) nas interações incompatíveis. A análise da biblioteca de cDNA da interação entre *T. cacao* e *M. pernicioso* permitiu a identificação de seqüências gênicas de três classes de proteases (serinas, cisteínas e aspárticos). O alinhamento dessas seqüências de proteases com seqüências públicas (Genbank) mostrou que elas possuem similaridades com seqüências de proteases de outras espécies de plantas e com isso foi permitido identificar a presença de regiões conservadas entre esses grupos. A expressão gênica das proteases foi analisada por sqRT-PCR utilizando meristemas de *T. cacao* controle e com a doença vassoura-de-bruxa. O sqRT-PCR foi normalizado a partir da amplificação do gene 18S, que é constitutivamente expresso. A análise da expressão gênica indicou expressão diferencial entre os genes *CYS* (1 e 2) e o *ASP* do *T. cacao*. Os genes *CYS* são mais expressos durante a fase da doença, onde provavelmente as cisteínas proteases estão participando do processo de degradação protéica e que levará mais adiante a morte celular na fase necrotrófica da doença. De um outro lado, a expressão do gene *ASP* é mais acentuada na planta sadia, portanto não tendo provavelmente envolvimento nesse processo de morte celular. Um teste de atividade proteolítica com amostras do fruto e meristema de cacau sadios e doentes demonstrou que a proteólise está presente em todas as fases, porém, a intensidade da degradação é maior nas plantas necrosadas.

Palavras chave: Interação planta-patógeno, vassoura-de-bruxa, morte celular programada, enzimas proteolíticas.

ABSTRACT

CARVALHO, Heliana Argolo Santos, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - BA, March 2007. Biochemical and molecular analysis of proteases from the interaction ***Theobroma cacao-Moniliophthora perniciosa***

Advisor: Fabienne Micheli. Advisor Committee: Abelmon da Silva Gesteira. Members: Márcio Gilberto Cardoso Costa e Júlio César de Mattos Cascardo.

The cacaoculture in the South of Bahia was highly prejudiced by the propagation of the witches' broom disease caused by the fungus *Moniliophthora* (= *Crinipellis*) *perniciosa* (Stahel) Singer. An important crisis occurred in the region due to lost of productivity associated to the decrease of the price product at the international level, contributed to the lost of the farmer's capitals and the expropriation of the farms. *M. perniciosa* is a hemibiotrophic fungus that provokes various symptoms on cacao like an important ramification known as witches' broom. Even if lot of efforts was made in order to develop strategies to contain or reduce these damages, the disease already increased. Unfortunately, few is known about the interaction *T. cacao-M. perniciosa* at molecular level, and for this reason, studies of possible mechanisms of resistance/susceptibility involved in this interaction are needed to understand and develop right methods which may contain the damages caused by *M. perniciosa*.

The analysis of the necrosis process in the cacao tissues during the infection by *M. perniciosa* showed that this interaction involves a programmed cell death process (PCD), and that cellular initiators characteristic of this PCD, like DNA

degradation, was identified (CEITA et al., publication accepted in *Plant Science*). Molecular studies realized in the Laboratório de Genética e Biologia Molecular of UESC demonstrated the presence of genes from different classes of proteases in the *T. cacao-M. perniciosa* resistant and susceptible interaction libraries. In the literature, these enzymes are related to PCD in the compatible interactions or to hypersensitive reaction (HR). The analysis of the *T. cacao-M. perniciosa* interaction cDNA libraries allowed the identification of sequences from three classes of protease (serine, cysteine and aspartic). The alignment of these protease sequences with public data (Genbank) showed that they are similar to protease sequences from other plant species, and this allowed the identification of conserved motives between these groups. The expression of protease genes was analyzed by RT-PCR using cacao meristem control or infected by *M. perniciosa*. The RT-PCR was normalized based on the amplification of the 18S gene which is constitutively expressed. The analysis of the gene expression showed a differential expression between the *CYS* (1 and 2) and *ASP* cacao genes. The *CYS* genes were more expressed in the phase of infection, where probably the cysteine proteases are participating of the protein degradation process, which will allow the PCD in the necrotrophic phase of the disease. In an other hand, the expression of the *ASP* gene was more important in the healthy plant, which probably was not related to the PCD process. A test of proteolysis activity with fruit and meristem samples from healthy and infected cacao showed that proteolysis activity is present in all the phases, but, that the degradation is higher in the necrotic plant.

Key words: plant-pathogen interaction, witches' broom, programmed cell death, proteolytic enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sintomas da vassoura-de-bruxa no cacaueteiro	6
Figura 2. Modelo proposto para as diferentes funções das proteases na defesa de plantas.....	20
Figura 3. Desenho de <i>primers</i> específicos para posterior síntese de cDNA por meio de RT-PCR semi-quantitativo	24
Figura 4. Material vegetal em diferentes estágios da doença.....	25
Figura 5. PCR com gradientes de temperaturas.....	27
Figura 6. Extração de RNA de meristemas de <i>T. cacao</i>	28
Figura 7. Alinhamento nucleotídico entre as seqüências de proteases para as quais <i>primers</i> específicos foram desenhados	34
Figura 8. Alinhamento protéico entre a seqüência proteolítica Cys1 de <i>T. cacao</i> e as seqüências de cisteína protease de <i>Sandersonia aurantiaca</i> , <i>Ipomoea batatas</i> e <i>Pachysandra terminalis</i>	35

Figura 9. Alinhamento protéico entre a seqüência proteolítica VPE de <i>T. cacao</i> e as seqüências de VPE de <i>Citrus sinensis</i> , <i>Glycine max</i> e <i>Nicotiana tabacum</i> ..	36
Figura 10. Alinhamento protéico entre a seqüência proteolítica Asp de <i>T. cacao</i> e as seqüências de aspártico protease de <i>Medicago truncatula</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> e <i>Oryza sativa</i>	37
Figura 11. Alinhamento protéico entre a seqüência proteolítica Cys2 de <i>T. cacao</i> e as seqüências de cisteína protease de <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> e <i>Lycopersicon esculentum</i>	38
Figura 12. Alinhamento protéico entre a seqüência proteolítica Ser de <i>T. cacao</i> e as seqüências de serina protease de <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Oryza sativa</i> e <i>Solanum lycopersicum</i>	39
Figura 13. Cladograma mostrando o agrupamento filogenético baseado na similaridade e na distância das seqüências das diferentes classes de proteases de <i>T. cacao</i> e demais espécies vegetais.....	41
Figura 14. Amplificação dos cDNAs de proteases de diferentes subgrupos com os <i>primers</i> específicos.....	42
Figura 15. Amplificação dos cDNAs de proteases pertencentes ao mesmo subgrupo com os <i>primers</i> específicos	43
Figura 16. Expressão gênica semi-quantitativa de proteases em meristema controle (MC) e meristema doente (MD)	44
Figura 17. Expressão relativa das proteases de <i>T. cacao</i> normalizadas pela expressão do 18S	45
Figura 18. SDS-PAGE das amostras de <i>T. cacao</i> e de <i>M. perniciosa</i>	46
Figura 19. Presença de atividade proteolítica nas amostras de <i>T. cacao</i>	49

Figura 20. Comparação da atividade proteolítica do *M. pernicioso* com o fruto necrosado e vassoura seca.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação e modo de ação das principais proteases.....	11
Tabela 2. Subclassificação das endopeptidases	12
Tabela 3. Características das proteases.....	15
Tabela 4. Microrganismos produtores de proteases e os seus principais inibidores.....	15
Tabela 5. Seleção de proteases	23
Tabela 6. Características dos primers utilizados neste estudo	24
Tabela 7. Similaridade de seqüências de aminoácidos de proteases de <i>T. cacao</i> com proteases de diferentes espécies vegetais	40
Tabela 8. Comparação da atividade proteolítica em tecidos vegetais de <i>T. cacao</i> com diferentes tampões e temperaturas.....	48

1. INTRODUÇÃO

A produção de cacau no Brasil, principalmente na região Sul da Bahia, teve um papel importante no desenvolvimento regional, trazendo empregos e colocando o país em destaque no cenário econômico internacional. Dentre as principais regiões produtoras de cacau no mundo destaca-se o Brasil (Bahia), Costa do Marfim, Nigéria, Camarões, Gana, Malásia e Indonésia (SOUZA; DIAS, 2001). Na região sul baiana, a cacauicultura vem sofrendo perdas significativas na produção, devido à presença de doenças que se estabelecem em suas plantações, ocasionando prejuízos econômicos de grande escala.

Dentre as principais doenças, destaca-se a vassoura-de-bruxa causada pelo fitopatógeno *Moniliophthora (=Crinipellis) perniciosa* (Stahel) Singer (AIME; MORA, 2005). Desde o ano de 1989 a vassoura-de-bruxa fez com que muitos agricultores abandonassem suas fazendas, provocando migrações de pessoas da zona rural para a zona urbana, o que afetou, por conseguinte, o cenário geográfico das cidades devido à formação de favelas em suas imediações (TREVIZAN, 1996).

O fungo *M. perniciosa* é um basidiomiceto, hemibiotrófico, que possui uma fase parasítica e uma outra saprofítica, provocando alterações morfológicas, histológicas e fisiológicas tecido-específicas e temporais no cacauzeiro (FRIAS et al., 1991; ORCHARD et al., 1994). O fitopatógeno infecta os lançamentos foliares novos, os frutos em desenvolvimento e as almofadas florais, podendo até provocar a morte da planta quando afetada por consecutivos ciclos do patógeno integrados a fatores abióticos (SILVA et al., 2002).

Medidas profiláticas como o controle cultural, biológico e químico, e também o uso de cultivares resistentes tem sido utilizados no controle dessa doença. Entretanto estudos moleculares vêm atuando como uma alternativa mais propícia na busca de mecanismos que são desencadeados nesta interação planta-patógeno. Estudos desta interação tem sido o foco de vários projetos de pesquisas e que tem a função de esclarecer os diversos mecanismos de defesa acionados pela planta contra o ataque de patógenos. Trabalhos realizados no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UESC forneceram evidências de que ocorre um processo de morte celular programada (PCD, *Programmed Cell Death*) em *T. cacao*, em resposta à infecção com *M. pernicioso*. Além disso, esse trabalho também sugeriu que prováveis mecanismos celulares, entre eles a degradação de proteínas, poderiam estar associados a este processo (CEITA et al., publicação aceita em *Plant Science*). Simultaneamente, genes expressos de diferentes classes de proteases foram descobertos em bibliotecas de cDNAs das interações compatíveis e incompatíveis do *T. cacao-M. pernicioso* (GESTEIRA et al., no prelo, *Annals of Botany*). Essas enzimas são conhecidas na literatura tanto relacionadas com a PCD (interação susceptível), como na HR (interação resistente) ao patógeno, bem como na defesa contra patógenos e pestes (HOEBERICHTS et al., 2003; SOLOMON et al., 1999).

As proteases são enzimas degradativas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas. Estão presentes em todas as células e tecidos degradando proteínas que se tornaram danificadas ou inúteis (GODFREY; WEST, 1996). O conhecimento a respeito das características funcionais destes genes poderá indicar qual é o verdadeiro papel dessas enzimas no processo de interação entre o *T. cacao-M. pernicioso*, e a partir dessas informações poder traçar metodologias que ajudarão a esclarecer os mecanismos envolvidos nesse patossistema. Esta dissertação teve como finalidade realizar uma análise bioquímica e molecular de proteases durante as interações compatíveis e incompatíveis do *T. cacao-M. pernicioso*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cacauicultura

O *Theobroma cacao* L. é uma planta diplóide $2n = 20$, dicotiledônea, arbórea e preferencialmente alógama. Antes era classificada como da família Sterculiaceae, hoje reclassificada como Malvaceae, nativa do continente Americano, onde possui grande diversidade nas populações selvagens que vão desde a Amazônia Brasileira ao México (SOUNIGO et al., 2003). Este gênero inclui outras 21 espécies, das quais apenas o cacau e o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) são espécies comercializadas (CUATRECASAS, 1964).

É cultivado nas Américas do Sul e Central, Caribe, África e Ásia, e as suas amêndoas representam a principal matéria prima para a indústria de chocolate, também na utilização da manteiga de cacau, polpas, geléias, dentre outros produtos. A região sul baiana é a principal produtora de cacau do Brasil, onde o cacauero foi introduzido pelo colono francês Luiz Frederico Warneaux no ano de 1746, através de sementes da variedade comum trazidas do Pará que foram plantadas na fazenda Cubículo, localizada à margem direita do Rio Pardo, município de Canavieiras (VELLO; GARCIA, 1971). Assim como o café e a cana-de-açúcar, a cultura do cacau marcou época na economia brasileira, sendo uma das principais fontes geradoras de divisas na década de 70. Nessa época, cerca de 90% da produção era destinada a exportação (BASTOS, 2000). A lavoura cacauera chegou a ser cultivada em 29 mil propriedades rurais, em uma área superior a 700 mil hectares, distribuído em 106 municípios (SOUZA; DIAS, 2001). Sob o ponto de vista econômico, é considerada uma das principais culturas neotropicais em todo o mundo, estimando-se que o valor

total da sua produção atinja cerca de três bilhões de dólares anuais (CHARTERS; WILKINSON, 2000).

O Brasil sempre teve destaque na produção de cacau, o que o fez ser considerado o principal país produtor das Américas no ano de 1994 (PURDY; SCHIMIDT, 1996). As doenças que acometem as suas plantações, porém, tem levado a redução da quantidade e qualidade do produto, além de elevarem os custos para os produtores. A importância sócio-econômica do cultivo de cacau é muito grande para os países produtores, em particular para o Brasil. A cadeia produtiva do cacau envolve investimentos da ordem de dois bilhões de reais, sendo 1,7 bilhão no setor primário (terra, árvores e benfeitorias). É responsável por aproximadamente 300 mil empregos diretos, mas do cacau dependem mais de três milhões de pessoas (DIAS, 2001).

Na década de 80, a vassoura de bruxa avançou por toda a região sul baiana. As perdas de produtividade do cacau associadas aos baixos preços do produto no mercado internacional contribuíram para descapitalização dos agricultores ocasionando um descaso e abandono das lavouras. Estes fatores levaram a uma redução da produtividade, afetando toda a região cacauzeira. Os mais afetados foram os produtores mais pobres e trabalhadores rurais que abandonaram as propriedades e migraram para favelas das cidades da região, aumentando a miséria e as diferenças sócio-econômicas (TREVIZAN, 1996).

2.2. A doença vassoura-de-bruxa

A vassoura-de-bruxa, inicialmente teve o seu agente etiológico descrito por Stahel, em 1915, como *Marasmius perniciosus*. No ano de 1942, Singer reclassificou esse patógeno como pertencente ao gênero *Crinipellis*, porém, por ocasião da revisão da sua sistemática, esse fungo passou a ser identificado como *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer. Atualmente ele é descrito como *Moniliophthora* (= *Crinipellis*) *perniciosa* (Stahel) Singer (AIME ; MORA, 2005). Esse fungo é um basidiomiceto, hemibiotrófico, da ordem Agaricales e família Tricholomataceae (SILVA et al., 2002).

Moniliophthora perniciosa infecta os lançamentos foliares novos, os frutos em desenvolvimento e as almofadas florais, podendo até provocar a morte da planta

quando afetada por sucessivos ciclos do patógeno associados a fatores abióticos (ANDEBRHAN, 1999; SILVA et al., 2002). Quatro biótipos de *M. pernicioso* são conhecidos, dos quais o biótipo-C é específico para o cacau. Dois patótipos do biótipo-C existem: o biótipo A, o mais patogênico, e presente na Bolívia, Equador e Colômbia; e o biótipo B, menos patogênico e presente no Brasil, Trinidad-Tobago e Venezuela (MOTILAL et al., 2003). Este fungo possui dois estágios diferentes de infecção: uma fase biotrófica e uma outra necrotrófica ou saprofítica. Na fase biotrófica o fungo existe na forma de um micélio monocariótico intercelular que causa hipertrofia e hiperplasia do tecido, perda de dominância apical, e proliferação de brotos e raízes axilares, a qual resulta na formação de uma haste anormal denominada vassoura verde. No segundo estágio, o fungo muda para fase saprofítica, com a difusão intracelular do micélio dicariótico, o qual causa necrose e morte do tecido distal até o ponto original de infecção, formando então a vassoura seca (Figura 1), segundo EVANS (1980). A produção de basidiocarpos e formação de esporos pode ocorrer em qualquer tecido necrótico infectado, após alternância de períodos secos e úmidos completando o ciclo da doença (ALMEIDA et al., 1997).



Figura 1. Sintomas da vassoura-de-bruxa no cacau. Em verde está representada a fase biotrófica da doença e em marrom a fase necrotrófica, demonstrando as principais características da doença nos órgãos vegetais. De acordo com Silva et al. (2002).

Vários esforços têm sido realizados pelos governos no sentido de conter a vassoura-de-bruxa e tentar recuperar a cacauicultura, utilizando métodos como o controle químico, cultural, biológico e genético e este último através da clonagem de materiais resistentes e o lançamento de novas variedades. O controle químico utiliza fungicidas que previne ou reduz a formação de basidiocarpos, mas corre o risco de afetar os grãos do cacau que são de grande valor comercial (PURDY; SCHMIDT, 1996). O controle cultural é realizado através da remoção e destruição de partes doentes da planta com potencial para a produção de basidiocarpos. Esse método é muito utilizado, porém, não é 100% seguro, isso porque muitas partes da planta, ainda em estágio inicial de infecção, passam despercebidas aos olhos do

manipulador. Uma outra estratégia no combate à vassoura-de-bruxa é o controle biológico (KRAUSS; SOBERANIS, 2001). Foi desenvolvido um biofungicida denominado Tricovab[®] pela CEPLAC/CEPEC a partir do fungo saprofítico *Trichoderma stromaticum*, antagonista ao *M. perniciosa* para a tentativa de redução da doença. Seu papel é eliminar o fungo por inanição, visto que *T. stromaticum* compete com *M. perniciosa* por nutrientes e espaço (BASTOS, 2000). O desenvolvimento desse método foi devido à observação de uma outra espécie do mesmo gênero, *T. viride*, que quando colonizava a vassoura no cacau, impedia a produção de basidiocarpos. Entre os problemas encontrados na utilização deste método se destaca a dificuldade de aplicação deste material nas plantações (AZEVEDO et al., 2000). Todas essas abordagens são eficazes, mas não representam uma medida definitiva. Uma outra abordagem para a problemática que envolve a vassoura-de-bruxa seria o desenvolvimento de variedades de cacauzeiros com uma produtividade alta e resistente ao patógeno (GRIFFITH et al., 2003). Durante muito tempo a CEPLAC vem desenvolvendo muitos trabalhos relacionados a programas de melhoramento do cacauzeiro através da genética clássica, e como essa planta perene requer vários anos ou décadas para que uma geração de melhoramento seja completada, muitas vezes a resistência acaba sendo quebrada pelo fungo (PINTO; PIRES, 1998). Neste objetivo, a engenharia genética, a genômica funcional e a biologia molecular vêm proporcionando através de suas técnicas o isolamento e a caracterização de genes do fitopatógeno e/ou do cacau em procedimentos bastante eficientes. Essas tecnologias, em conjunto com o melhoramento tradicional, serão úteis no desenvolvimento de culturas com alta produtividade e com resistência a pragas e doenças, tudo isso com o intuito de conter o desenvolvimento do *M. perniciosa* através do estabelecimento de variedades de cacauzeiros resistentes à vassoura-de-bruxa. Também, os programas de genômica funcional atualmente desenvolvido proporcionam uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência e de susceptibilidade do cacauzeiro ao *M. perniciosa*. Nos últimos anos muitos trabalhos têm sido realizados com o intuito de analisar genes envolvidos nas interações plantas-patógenos. Diferentes bibliotecas de ESTs da interação cacau-*M. perniciosa* foram obtidas através de trabalhos realizados pela UESC, CEPLAC/CEPEC e Cirad. Bibliotecas de cDNA de frutos e de meristemas de plantas foram seqüenciadas, o que permitiu a identificação de genes expressos relacionados à resistência e a susceptibilidade. Na

UESC foram desenvolvidas duas bibliotecas de meristemas de plantas resistentes (TSH 1188) e suscetíveis (Catongo) a vassoura-de-bruxa, onde foram geradas cerca de 6884 ESTs (GESTEIRA et al., no prelo, *Annals of Botany*). Na CEPLAC foi desenvolvida uma biblioteca de ESTs de frutos de TSH 1188, onde foram totalizadas 866 seqüências, sendo que dessas seqüências, 11 eram homólogas a proteínas de fungos e 9 tinham homologia com seqüências do banco de dados de *M. pernicioso* (ZAIDAN et al., 2005). No projeto internacional desenvolvido pelo Cirad, uma coleção de 180.000 clones de cDNA de cacau (ESTs e clones SSH), isolados de dois genótipos (Scavina 6 e ICS1) e de diferentes órgãos (sementes, flores, raízes) submetidos a estresse bióticos e abióticos, esta sendo obtida (LANAUD et al., 2006).

Pesquisas também realizadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UESC demonstraram que um processo de morte celular programada (PCD, *Programmed Cell Death*) está presente na interação compatível *T. cacao-M. pernicioso*, e que indicadores celulares característicos dessa PCD, como a degradação do DNA também estão envolvidos (CEITA et al., publicação aceita em *Plant Science*). Estes resultados sugerem que prováveis mecanismos celulares como a degradação protéica associada à morte celular programada poderia estar envolvida nessa interação. Do mesmo modo, genes expressos de diferentes classes de proteases foram identificados nas bibliotecas de ESTs das interações compatíveis e incompatíveis de *T. cacao-M. pernicioso*, sugerindo também que essas enzimas poderiam ter um papel importante nessa interação. As proteases têm envolvimento nos processos de PCD em diversas interações planta-patógenos, podendo ter um importante papel nos processos de resistência bem como de susceptibilidade no patossistema *T. cacao-M. pernicioso*.

2.3. Enzimas proteolíticas / proteases: definição e classificação

2.3.1. Definição

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA com propriedades catalíticas, todas as enzimas são proteínas. A sua atividade catalítica depende da integridade da sua conformação protéica nativa. A atividade catalítica é sempre destruída quando uma enzima é rompida em seus aminoácidos componentes. Assim, as estruturas protéicas primárias, secundárias, terciária e quaternária das enzimas são efetivas para a função de atividade catalítica (LEHNINGER, 1995). A propriedade mais significativa de uma enzima é a sua capacidade de catalisar uma reação específica. Sob condições apropriadas, a velocidade de uma reação enzimática depende das concentrações da enzima e do substrato.

A ligação covalente mais importante que une os aminoácidos para formar peptídeos e proteínas é denominada ligação peptídica. As ligações peptídicas podem ser hidrolisadas por determinadas enzimas chamadas proteases, proteinases ou enzimas proteolíticas, encontradas em todas as células e tecidos, onde degradam proteínas que se tornaram dispensáveis ou lesadas. As proteases pertencem ao grupo das hidrolases as quais tem em comum o envolvimento da água na formação do produto. Durante a reação de hidrólise das ligações peptídicas ocorre à transferência de componentes do substrato para a água (WHITAKER, 1994). Esse processo proteolítico resulta em uma mudança específica da função da proteína sendo um importante mecanismo biológico (LOPEZ; OVERALL, 2002).

Em vários microrganismos, como bactérias, protozoários e fungos são encontrados proteases. Elas podem ser extracelulares e intracelulares, e ligadas ou não a membrana (NEURATH, 1989). O grupo das proteases é extremamente diverso o que necessita o uso de vários procedimentos analíticos para o desenvolvimento de ensaios (SAID; PIETRO, 2002).

2.3.2. Classificação das proteases

De acordo com o comitê de nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUB, 1992), as proteases são classificadas em dois grupos principais, que são as exopeptidases e endopeptidases, dependendo do sítio de ação dessas enzimas na proteína. As exopeptidases iniciam o processo de degradação a partir das extremidades amino (N) ou carboxi-terminal (C) das proteínas, produzindo pequenos peptídeos ou mesmo aminoácidos. As endopeptidases clivam a proteína alvo na sua parte interna, longe das extremidades amino e carboxi-terminal, gerando dessa forma, peptídeos maiores. Baseado no tipo do grupo funcional presente no sítio catalítico da enzima, as proteases são classificadas ainda em quatro relevantes grupos, que são: serina, cisteína, aspártico e metalo proteases (Tabela 1; HARTLEY, 1960). Existem diversas proteases que não se ajustam precisamente no padrão de classificação, como exemplo as proteases ATP - dependentes que requerem ATP para a sua atividade (MENON; GOLDBERG, 1987). Com base nas suas seqüências de aminoácidos, as proteases são ainda classificadas em famílias diferentes e também em “clãs” para acomodar os grupos de peptidases que evoluíram de um antepassado em comum (RAWLINGS; BARRETT, 1993).

As exopeptidases atuam próximo ao final das cadeias polipeptídicas. Baseado no sítio de clivagem na região (N) ou (C) da proteína, as proteases são ainda classificadas como aminopeptidases e carboxipeptidases (Tabela 1). As aminopeptidases agem na região (N) da cadeia polipeptídica podendo liberar um único aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo. As aminopeptidases são encontradas em uma ampla variedade de espécies microbianas inclusive bactérias e fungos (WATSON, 1976). Geralmente, essas enzimas são intracelulares, mais já foi descrita uma aminopeptidase extracelular produzida por *Aspergillus oryzae* (LABBE et al., 1974).

Tabela 1. Classificação e modo de ação das principais proteases. Os círculos brancos representam os aminoácidos da cadeia polipeptídica. Os círculos pretos indicam os aminoácidos terminais. As setas indicam os sítios de ação das proteases. De acordo com Rao et al. (1998).

Protease	Modo de ação	EC n°
Exopeptidases		
Amino peptidase	•↓-○-○-○-○---	3.4.11
Dipeptidil peptidase	•-•↓-○-○-○---	3.4.14
Tripeptidil peptidase	•-•-•↓-○-○-○---	3.4.14
Carboxipeptidase	---○-○-○-○-○↓-•	3.4.16-3.4.18
Serina protease		3.4.16
Metalo protease		3.4.17
Cisteína protease		3.4.18
Peptidil dipeptidase	---○-○-○-○↓-•-•	3.4.15
Dipeptidase	•↓-•	3.4.13
Endopeptidases		
Serina protease	----○-○-○↓-○-○-○	3.4.21-3.4.34
Serina protease		3.4.21
Cisteína protease		3.4.22
Aspartico protease		3.4.23
Metalo protease		3.4.24

As carboxipeptidases agem na região (C) da cadeia polipeptídica e liberam um único aminoácido ou um dipeptídeo. Podem ser classificados em três grupos principais, serina, cisteína e metalo carboxipeptidases, baseado na natureza dos resíduos de aminoácidos no sítio catalítico das enzimas (Tabela 1).

As endopeptidases são caracterizadas por sua ação preferencial nas regiões internas das cadeias polipeptídicas, distante das regiões amino e carboxi-terminais. Elas são divididas em quatro subgrupos baseados no seu mecanismo catalítico em: (1) serina protease, (2) aspártico protease, (3) cisteína protease e (4) metalo protease (Tabela 2; RAWLINGS; BARRETT, 1993).

Tabela 2. Subclassificação das endopeptidases.

Serina protease	Serina alcalina
	Subtilisina
Aspártico protease	A1 (Pepsinas)
	A2 (Retropepsinas)
	A3 (Enzimas de pararetrovíroses)
Cisteína protease	Papaína
	Tripsina
	Específica para ácido glutâmico
	Outros (caspases, VPEs, ...)
Metalo protease	Neutro
	Alcalino
	Mixobacter I e II

A serina protease tem como característica a presença de um grupo serina no seu sítio ativo. É abundante e distribuída entre vírus, bactérias e eucariotos, o que é indicativo de que ela seja vital aos organismos, estando presentes nas exopeptidases e endopeptidases (Tabelas 1 e 2). De acordo com as suas semelhanças estruturais, as serinas proteases se agrupam em 20 famílias que foram posteriormente subdivididas em aproximadamente seis clãs com antepassados comuns (BARETT,1994). Outra interessante característica da serina protease é a conservação de resíduos de glicina próximo ao sítio catalítico contendo a serina, formando o motivo Gly-Xaa-Ser-Yaa-Gly (BRENNER, 1988). Serinas proteases alcalinas que são ativas em pH altamente alcalino representam o maior subgrupo de serinas proteases. São produzidas por várias bactérias, leveduras e fungos. Elas hidrolisam uma ligação peptídica que tem tirosina, fenilalanina ou leucina na região carboxila. A subtilisina originada de *Bacillus* representa a segunda maior família de serinas proteases. Foram identificados dois tipos diferentes de proteases alcalinas, a subtilisina Carlsberg e a subtilisina nova ou protease bacteriana Nagase (BPN') (Tabela 2). Ambas as enzimas apresentam uma larga especificidade de substrato e tem uma tríade no sítio catalítico composto de Ser221, His64 e Asp32. A conformação do sítio catalítico da subtilisina é semelhante à tripsina e quimiotripsina apesar da sua diferença global nos arranjos moleculares.

O aspártico protease, conhecido como protease ácida, é uma endopeptidase que depende de um resíduo de ácido aspártico para a sua atividade catalítica. Proteases ácidas se agrupam em três famílias, (A1) pepsinas, (A2) retropepsinas e (A3) enzimas de pararetrovíroses (BARETT, 1995), e foram colocadas no clã AA (Tabela 2). Os sócios da família são conhecidos como A1 e A2 e são relacionados um com o outro, enquanto os membros da família A3 apresentam alguma relação com A1 e A2 (Tabela 2). O resíduo de ácido aspártico do sítio catalítico da protease situa-se dentro do motivo Asp-Xaa-Gly, onde Xaa pode ser uma Ser ou Thr (SIELECKI et al., 1991).

As cisteínas proteases são encontradas em procariotos e eucariotos. Aproximadamente 20 famílias de cisteínas proteases foram reconhecidas. Sua atividade depende de uma díade catalítica que consiste em uma cisteína e uma histidina. A ordem dos resíduos Cys ou His (Cys-His ou His-Cys) difere entre as famílias. Geralmente são ativas somente na presença de agentes redutores tais como HCN ou cisteína. Segundo BARETT (1994), com base na especificidade no sítio de clivagem na proteína, elas são divididas amplamente em quatro grupos: (1) papaína, (2) tripsina, com preferência pelo resíduo de arginina, (3) específico para ácido glutâmico, e (4) outros (caspase, VPE) (Tabela 2).

As metalo proteases representam os mais diversos tipos catalíticos de proteases, que incluem enzimas de uma grande variedade de origens como as collagenases de organismos superiores, toxinas hemorrágicas de veneno de cobras e termolisina de bactérias. Tem como característica a exigência de um íon metal divalente para a sua atividade (HIBBS et al., 1985). Foram reconhecidas aproximadamente 30 famílias de metalo proteases, das quais 17 são endopeptidases, 12 exopeptidases, e 1 (M3) contém ambos, endopeptidases e exopeptidases e ainda se agrupam em diferentes clãs. Dependendo da sua especificidade de ação, as metalo proteases podem ser divididas em quatro grupos, (1) neutro, (2) alcalino, (3) Mixobacter I e (4) Mixobacter II (Tabela 2). As proteases neutras mostram especificidade para aminoácidos hidrofóbicos, enquanto as proteases alcalinas possuem uma larga especificidade. Mixobacter I são específicas para resíduos de aminoácido pequenos em qualquer lateral da cadeia polipeptídica, considerando que Mixobacter II é específico para resíduo de lisina no lado amino da cadeia peptídica (BARETT, 1995).

Além de todas as características citadas anteriormente para cada uma das famílias de proteases, outras importantes características como, os organismos produtores de proteases, o pH ótimo, o peso molecular e os inibidores proteolíticos são também pontos importantes a serem destacados e que possuem um papel fundamental dentro de cada um desses grupos de enzimas. As principais destas características são detalhadas nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Características das proteases.

Proteases	Organismos	pH	Peso molecular (kDa)	Referências
Aspártico protease	Fungos	Ácido	30 - 45	SIELECKI et al., 1991
Cisteína protease	Procariotos e eucariotos	Neutro; ácido (cisteína lisossomal)	Específico por sub-grupos	BARRET, 1994
Metalo protease	Eucariotos, bactérias e fungos	Neutro e alcalino	48 - 60	SHANNON et al., 1989
Serina alcalina	Bactérias, leveduras e fungos	Alcalino	15 - 30	BOGUSLAWSKI et al., 1983
Serina protease	Eucariotos, vírus e bactérias	Alcalino	18 - 35 126 (<i>B. trispora</i>)	BARRET, 1994 GOVIND, 1981
Subtilisina	Bactérias (<i>Bacillus</i>)	Alcalino	27,5	PHADATARE et al., 1993

Tabela 4. Microrganismos produtores de proteases e os seus principais inibidores.

Proteases	Microorganismos	Inibidores de proteases	Referências
Aspártico protease	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp., <i>Neurospora</i> spp., <i>Endothia mucor</i> spp.	Pepstatina Diazoacetil-DL-norleucina metil ester (DAN) 1,2- epoxi-3- (p-nitrofenoxe) propano (EPNP)	SIELECKI et al., 1991
Cisteína protease	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Clostridium hystolyticum</i>	Agentes sulfidril (PCMB) Cistatina E-64d	SOLOMON et al., 1999 BELENGHI et al., 2003
Metalo protease	<i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>Clostridium hystolyticum</i> , <i>Achromobacter iophagus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia</i> spp., <i>Arthrobacter crystellopoites</i>	Agentes quelantes (EDTA)	BROWNER et al., 1995 SHANNON et al., 1989
Serina protease	<i>Blakeslea trispora</i> , <i>Arthrobacter</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp., <i>Flavobacterium</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Conidiobolus</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Neurospora</i> spp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Conidiobolus coronatus</i>	3,4- dicloroisocoumarino (3,4-DCI) L-3- carboxitrans 2,3- epoxipropil-leucilamido (4-guanidina) Butano (E.64) Diisopropilfluorofosfato (DFP) Fenilmetilsulfonil fluorido (PMSF) Tosil-L lisina clorometil cetona (TLCK)	GOVIND, 1981 BOGUSLAWSKI et al., 1983 PHADATARE et al., 1993. LINDBERG et al., 1981

2.4. Funções das proteases

As proteases realizam uma grande variedade de complexas funções fisiológicas. Tem grande importância no metabolismo e funções regulatórias, o que torna evidente a sua ocorrência em todos os tipos de organismos vivos. Em humanos e animais, proteases apresentam um papel crucial dentro de muitos processos fisiológicos e patológicos, como o catabolismo de proteínas, coagulação sanguínea, crescimento e migração celular, morfogenia e desenvolvimento, inflamação, crescimento de tumores e metástases, ativação de zimogênio, liberação de hormônios, e transporte de proteínas secretoras através das membranas (GODFREY; WEST, 1996). Em plantas e microorganismos, das diversas atividades desempenhadas pelas proteases, podemos destacar a esporulação e liberação conidial, germinação, modificação de proteínas, regulação da expressão gênica, morte celular programada e resistência de plantas (BEERS et al., 2004; TORNERO et al., 1996).

Comparado com a abundância de papéis realizados pelas proteases, o conhecimento sobre os mecanismos pelos quais elas executam estas funções ainda é muito limitado (GODFREY; WEST, 1996). Porém, amplas pesquisas como o sequenciamento e a análise de genomas de plantas permitiram a identificação de várias classes de proteases. O genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica mais de 500 proteases com 50 famílias diferentes, divididas em mais de 27 clãs e pertencentes às quatro classes (serina, cisteína, aspártico e metalo proteases) que refletem uma larga variedade de possíveis funções executadas por proteases, mas ainda não totalmente identificadas (ADAM; CLARK, 2002).

Com relação às funções das proteases, neste trabalho um maior enfoque será dado ao envolvimento das proteases na morte celular programada e na defesa de plantas.

2.4.1. Envolvimento das proteases na morte celular programada e na defesa de plantas

Cisteínas proteases são bastante caracterizadas e estudadas em animais onde estas enzimas são conhecidas como caspases (GRUTTER, 2000). Em animais, elas estão envolvidas em um mecanismo de morte celular chamado apoptose, processo geneticamente programado que se caracteriza pela condensação nuclear, encolhimento do citoplasma, clivagem de DNA nuclear em oligonucleossomos e pela formação de corpos apoptóticos (DANGL et al., 2000). O processo apoptótico é dividido em várias fases, sendo a última a fase de degradação de DNA e de proteínas nas células. Em plantas, o mecanismo de morte celular programada (*Programmed Cell Death*, PCD), similar a apoptose, também ocorre em diferentes fases do desenvolvimento da planta (embriogênese, formação dos elementos traqueais, etc) bem como em resposta a estresses bióticos e abióticos (CHICHKOVA et al., 2004; WATANABE; LAM, 2004; WOLTERING et al., 2002). Entre outros, a resposta hipersensível (HR) é um mecanismo de defesa das plantas contra patógenos e que possui características semelhantes a apoptose animal.

Embora no genoma de plantas ainda não tenham sido identificados os genes de caspases, a sua existência vem sendo muito especulada em vários trabalhos.

Pesquisas analisando homologias entre caspases de diferentes espécies têm revelado a existência de dois grupos: as paracaspases que são encontradas em humanos e *Caenorhabditis elegans* e as metacaspases, encontradas em fungos e plantas (UREN et al., 2000). A participação de cisteína protease do tipo caspase em processos de PCD ocorrido em plantas foi observada em tomate, onde se isolou o gene de metacaspase denominado *LeMCA1*. Nas folhas infectadas com *Botrytis cineria* e que sofriam PCD, ocorria um aumento nos níveis de expressão deste gene (WATANABE; LAN, 2004). Estudos demonstraram a presença de uma caspase denominada VEIDase, envolvida na PCD e que é essencial na formação do padrão embrionário em plantas. A sua atividade é aumentada nas fases de desenvolvimento do embrião, na diferenciação terminal e na morte do embrião. A VEIDase de planta se assemelha à caspase-6 de mamíferos e a metacaspase de levedura (YCA1) segundo BOZHKOV et al. (2004). A metacaspase do tipo II de *Picea abies*, *mclI-Pa*, é requerida para a atividade proteolítica durante a embriogênese somática nas

células que se encontram em PCD, e é essencial para o desenvolvimento do embrião (SUAREZ et al., 2004).

Outras proteases com atividade similar a das caspases em plantas são as VPEs (*Vacuolar Processing Enzymes*). Estas enzimas foram bem estudadas quanto ao seu papel na maturação de proteínas armazenadas dentro dos vacúolos das sementes (SHIMADA et al., 2003). Atualmente as VPEs estão sendo relacionadas com caspases animais quanto a sua ordem e estrutura terciária, e também associadas com processos de PCD em plantas, o que sugere que são homólogos verdadeiros das caspases. Em *Arabidopsis* foram identificados quatro genes de VPEs, sendo que um destes genes, o γ VPE, se acumula quando ocorre o ferimento da planta por patógenos tendo um importante papel na defesa (ROJO et al., 2004). VPEs de *Nicotiana benthamiana* são requeridas para o rompimento do tonoplasto, um processo comum na maioria dos casos de PCD em plantas e que constituem possivelmente uma etapa irreversível na morte da célula. Embora a localização das VPEs de *N. benthamiana* não tenha sido descrita, são prováveis a sua localização nos vacúolos. Além disso, VPEs podem agir posteriormente ao rompimento do tonoplasto, acionando enzimas citosólicas envolvidas na execução da PCD. Esta função é similar ao papel das catepsinas animais, que são proteases lisossomais que quando liberadas dos lisossomos danificados ativam uma cascata proteolítica no citosol, provocando a apoptose (FERRI; KROEMER, 2001). A expressão do VPE é induzida em circunstâncias em que a PCD é ativada, tal como na infecção do tabaco pelo TMV ou na senescência e ataque de patógenos em *Arabidopsis*, indicando que a regulação da sua atividade pode estar em parte no nível transcricional (HATSUGAI et al., 2004; ROJO et al., 2004).

A papaína é uma cisteína protease pequena, identificada no látex de várias espécies de plantas, e que tem uma larga especificidade de substrato. Ela catalisa a remobilização de proteínas durante a germinação de sementes e a senescência de órgãos, e está envolvida em numerosos eventos de PCD (VAN DER HOORN; JONES, 2004). As papaínas são importantes na defesa contra patógenos e insetos (BEERS et al., 2004; PECHAN et al., 2000). Foi demonstrado por KOONO et al. (2003) que, através da utilização de dietas artificiais contendo papaína nas concentrações que estão presentes no látex, e quando aplicadas no figo, tornava-se tóxica para insetos e larvas do bicho-da-seda. As larvas quando se alimentavam com folhas de figo contendo papaína morriam, pois, o seu acúmulo no local do

ferimento e a concentração encontrada no látex era muito tóxica. Do mesmo modo quando o látex era retirado ou quando se utilizava um inibidor de papaína (E64) a larva não morria, demonstrando sua eficiência na defesa da planta. A proteína Mir1 é também uma papaína encontrada em calos de milho e tem a função de defesa contra insetos herbívoros quando acumulada no local de ferimento da planta durante a alimentação larval. Mir1 através da sua atividade proteolítica pode também liberar outras combinações tóxicas, sinalizando intermediários (KONNO et al., 2003; PECHAN et al., 2000).

Em 2002, KRUGER et al. identificou uma papaína de tomate RCR3 (*Required for Cladosporium Resistance* – 3) requerida para a função do gene de resistência *Cf-2* e que proporciona o reconhecimento do gene de avirulência *Avr2* do fungo patógeno *Cladosporium fulvum*. A localização apoplástica de RCR3 e sua exigência para a função de *Cf-2* e não da proteína *Cf-5* altamente homólogas, sugere que RCR3 pode agir em *Cf-2*, mediando a percepção da proteína *Avr2*. RCR3 pode partir de *Avr2*, *Cf-2* ou de outras proteínas de plantas para ativar a resposta de defesa. Em *Arabidopsis thaliana* foi estudada RD21 (*Responsive to desiccation-21*) uma papaína que se acumula em vesículas que dão origem aos corpos de retículo endoplasmático, e que esta relacionada com a defesa contra insetos quando o tecido é ferido pelos mesmos ao se alimentarem. Em batata também foi observada a indução da proteína RD21 durante a infecção da planta por *Phytophthora infestans* (AVROVA et al., 1999; VAN DER HOORN; JONES, 2004).

As proteases possuem distintos papéis na defesa de plantas, podendo agir em níveis de percepção, sinalização e execução. Existem várias possibilidades das plantas perceberem a presença do patógeno, uma delas é através de elicitores dos invasores que se ligam às proteases podendo ativar ou inibir a sua atividade, e esse complexo elicitor-protease alterando a atividade proteolítica pode induzir a sinalização da defesa (VAN DER HOORN; JONES, 2004). Um exemplo ocorre com P34, um homólogo de cisteína protease que se liga ao elicitor de syringolide e que provavelmente confere reconhecimento deste elicitor em plantas resistentes (JI et al., 1998). Também, as metacaspases são fortes candidatas a sinalizar respostas de defesa em plantas (MADEO et al., 2002). As proteases podem ainda executar a resposta de defesa degradando as proteínas diretamente do invasor, liberando toxinas e ativando enzimas das suas proteínas precursoras (Figura 2).

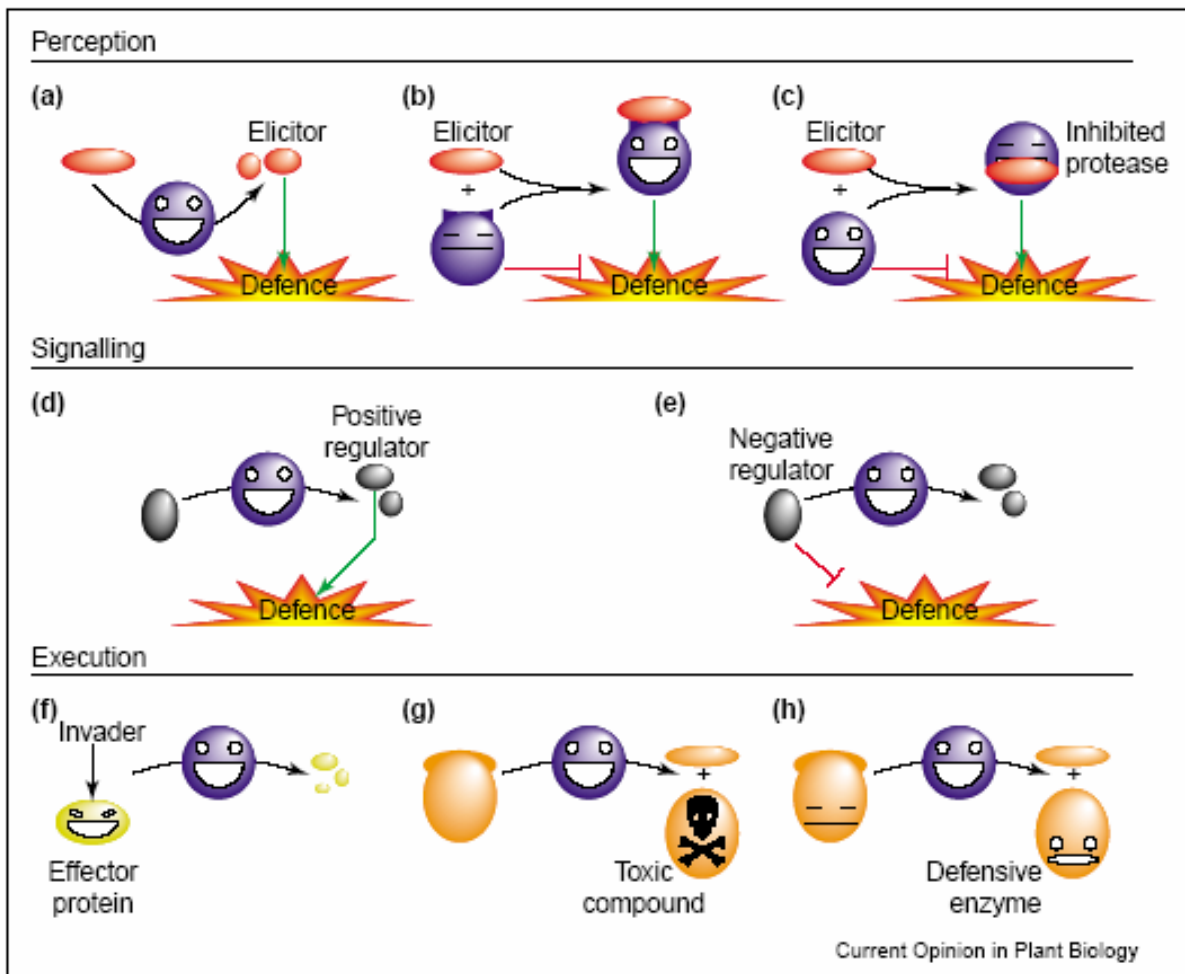


Figura 2. Modelo proposto para as diferentes funções das proteases na defesa de plantas. As bolinhas azuis representam as proteases: (a-c), proteases agindo na percepção; (d-e) na sinalização; e (f-h), na execução. As setas verdes indicam a sinalização positiva, e as barras vermelhas a sinalização negativa da resposta de defesa (VAN DER HOORN; JONES, 2004).

Proteases que se acumulam em altos níveis no local de invasão do patógeno são fortes candidatas a esse papel (VAN DER HOORN; JONES, 2004.). Esta atividade é vista em cisteínas proteases (exemplo MIR1; PECHAN et al., 2000), em subtilisinas (exemplo P69; TORNERO et al., 1996) e em metalo proteases (exemplo LapA; PAUTOT et al., 1993). Em muitos casos, as funções propostas para as proteases têm sido deduzidas através de estudos de expressão diferencial, embora muitas vezes, o seu papel seja impedido significativamente devido a sua regulação ocorrer pós-transcricionalmente (VAN DER HOORN; JONES, 2004).

A quantidade de cisteínas proteases envolvidas na defesa contra patógenos é muito grande, de maneira que elas se destacam dentre as demais classes de proteases, porém, podemos ressaltar a identificação do gene CDR1 (*Constitutive Disease Resistance*), que codifica um aspártico protease, que se acumula no apoplasto em resposta ao ataque de patógenos. O aumento da expressão de CDR1 causa a resistência e impede o desenvolvimento do patógeno *Pseudomonas syringae* na planta. Esse gene tem como características a ativação dependente de ácido salicílico, micro explosões oxidativas e também uma relação com vários genes de defesa (XIA et al., 2004). Serinas proteases como a LRP uma proteína rica em leucina possui a função de se acumular em tomateiros durante a infecção por patógenos (VAN DER HOORN; JONES 2004).

É muito grande a diversidade de papéis desenvolvidos pelas proteases, principalmente em plantas, por isso o estudo dessas enzimas proporcionará um melhor conhecimento a respeito da interação que ocorre em vários patossistemas, e em especial entre o *T. cacao- M. perniciosa*.

O objetivo desse trabalho foi caracterizar bioquimicamente e molecularmente as proteases envolvidas na interação *Theobroma cacao- Moniliophthora perniciosa*; fazer uma análise bioinformática das seqüências de proteases das bibliotecas de cDNA dessas interações; realizar um estudo da expressão gênica por semi-quantitativo RT-PCR (sqRT-PCR) das proteases durante o desenvolvimento da doença e a detecção da atividade enzimática das proteases também durante o desenvolvimento da doença.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Re-sequenciamento dos clones

Os clones de cDNA previamente extraídos dos transformantes bacterianos da biblioteca de ESTs da interação *T. cacao-M. pernicioso* se encontravam estocados em freezer -20°C. Estes foram utilizados para o re-sequenciamento e posterior identificação das proteases presentes. O re-sequenciamento permitiu a seleção de seqüências de proteases de três diferentes classes que se encontravam nas bibliotecas de resistência (RT; TSH1188) e na suscetível (SP; Catongo), como mostra a Tabela 5.

3.2. Análises de seqüências gênicas

As seqüências de proteases identificadas na biblioteca de ESTs da interação *T. cacao-M. pernicioso* (GESTEIRA et al., no prelo, *Annals of Botany*) foram analisadas com programas disponíveis nos seguintes endereços eletrônicos: análise de similaridade de seqüências, BLAST - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; tradução das seqüências de nucleotídeos, Translate tool - <http://au.expasy.org/tools/dna.html>; alinhamento de seqüências, MultAlin - <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>; e ClustalW - <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>, também utilizado para construir um cladograma.

Das seqüências identificadas na biblioteca de ESTs, foram escolhidos genes de cada uma das famílias de proteases (serina, cisteína e aspártico), para desenhar os *primers* e realizar a análise da expressão gênica.

Tabela 5. Seleção de proteases. P: placa do clone; demais letras: poço da placa.

Biblioteca	Família de protease	Número do clone
Resistente TSH1188 (RT)	Cisteína protease	P29A01
		P59D04
		P15D08
	Serina protease	P53C08
		P60C06
		P07F07
		P49F12
		P12F08
	Aspártico protease	P55B02
		P14F12
P30F02		
P47G09		
VPE (cisteína)	P27D12	
Suscetível Catongo (SP)	Cisteína protease	P25E05
		P11F10
		P16E08
	Aspártico protease	P24D08
		P47G01
		P05E12
	VPE (cisteína)	P36G03
	P18A05	

3.3. Desenho de *primers* específicos para análise da expressão gênica

A análise das seqüências permitiu o desenho de cinco *primers* senso e cinco anti-senso para os cinco distintos cDNAs de proteases escolhidos do *T. cacao* com a intenção de avaliar a expressão desses genes via sqRT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*) (Figura 3). As características dos *primers* são descritas na tabela 6.

Primer VPE
ACATCTGCAATGCTGGAATTCAGACAGAGCAGATGGCTGAGGCATCAGCTCAAGCTTGTGTCAGCATTCCCTTCTG
 GTCATTGGAGCTCTGTTTCAGAAAAGGGTTTCAGTGCATAAAATACAGCAGAATAGGCAATATTTAAAGGCCAAACCTTG
 GATTATGTTGTAATCCACAATGTGGTTTCCATCATAACAGATTGTCCAAACGCTGCATTTATATGATAGTTAATG
 TGATTGCTTGTGTGTAATAATTTAGGAGCAACTCTGTACCAGACTGCCTTAATTTAAGTATATGCATCAGATG
 TAAGTGTGTATCTGATTGTATGAATCTTTTCCCATATGTTGAATGGA

Primer CYS1
CTGGATCATCAAGAATTCCTGGGGAGAAAATTGGGGAGAGGAGGGATATTACAAGATCTGCAGGGGTCGCAATGT
 TTGTGGAGTGGACTCAATGGTCTCAAGTGTAGCTGCCTTGCAAACAAAGTCACAGTAGATTTTCTTCGTAAATAT
 TAAGTAGATGATAATGCAACTTACATATATTTCCAGATTTATGCCAGTACTTAAGACTTTTGCATTTGCTCTGGC
 TGGAAACTGAGTACCCGATAGGGGGGGTGTATGCTAGAGATAATTAGTAAATAGTTGTGTGCTAATTAAGACTT

Primer CYS2
GTGAAGGCTCTAAGGCGCACTCCTGCCAAACCTTTCTGGGCACATGGAAGTGTAGGCCAAAAGAGCAATGCTTAA
 GTAGTGGCCTGGGATTTTAAGCAGTAGATGATGTTAAAGGGAGGATGAAAGACAGGTCGATGGCGCTCAATGTTT
 TCCTTGGTTTTATCGTACTGCAATCCTCCTTTCAATTTACATACCCAAGGATGGATGGTTTTATAAAAAGTTACTCAG
 ATGCCAATTATGTATATAGCGTCTAATTATCCATGTTGCATTGGGGAAACAGACAGAACGCAGGCCAATTTGTAT
IGTTG

Primer ASP
GAAAACCTCTGGGACGGTGTATTCTGTTGGTGCCCATGACATTGCTTCAGCTTCCAGTTTGACAATCGAAGGAATT
 CTAACATTCTTGTCTATACTAATTGCTTTACTGCACAGTTCTATAGCTTAG

Primer SER
ATTGCTGTTAGGTGGCCTCAGGACTCAAGGATTCATTTGATTTGCGAATTGAAATGCTGTAAATAATTAGGGG
 ACATCCCTCGTTCTAGCTAGCTAAACGTTGGGGCTGTACTTTTTATCATCTTCCACAAATTAGGACATCTTG
 TCATAACTTTTCATTCTACTTGTATTTTCTGTTGCACCATTGATTAGAGTTGATCAATGACGGATTCCAGGAAAT
TAC

Figura 3. Desenho de *primers* específicos para posterior análise da expressão gênica por meio de sqRT-PCR.

Tabela 6. Características dos *primers* utilizados neste estudo.

Clone de protease	<i>Primer forward</i>		<i>Primer reverse</i>		Amplificação (pb)
	Seqüência	Tm °C	Seqüência	Tm° C	
VPE	5' ACATCTGCAATGCTGG 3'	43,6	5' TCCATTCAACACATATGG 3'	43,1	351
Cys1	5' CTGGATCATCAAGAATTC 3'	40,8	5' AAGTATTAAGCACAC 3'	35,0	299
Cys2	5' GTGAAGGCTCTAAGG 3'	34,7	5' GAACAATAGAAATTGGC 3'	38,6	305
Asp1	5' GAAAACCTCTGGGACGGTG 3'	49,6	5' CTAAGCTATAGAACTGTG 3'	32,8	126
Ser	5' ATTGCTGTTAGGTGG 3'	36,0	5' GTAATTTCTGGAATCC 3'	40,1	228

3.4. Material vegetal

Os meristemas e frutos de *T. cacao* (variedade Catongo; planta suscetível) controles e em diferentes fases da doença vassoura-de-bruxa, foram coletados na cabruca da UESC, onde se utilizou para os experimentos os meristemas saudios, a vassoura verde e a vassoura seca, também o endocarpo do fruto sadio, o endocarpo

no início da doença e também o necrosado (Figura 4), eles foram congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer -80°C. Esse material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e utilizado para realizar os testes de atividade proteolítica (meristemas e frutos) e extração de RNA total (meristemas) para a determinação da expressão gênica por meio de sqRT-PCR.

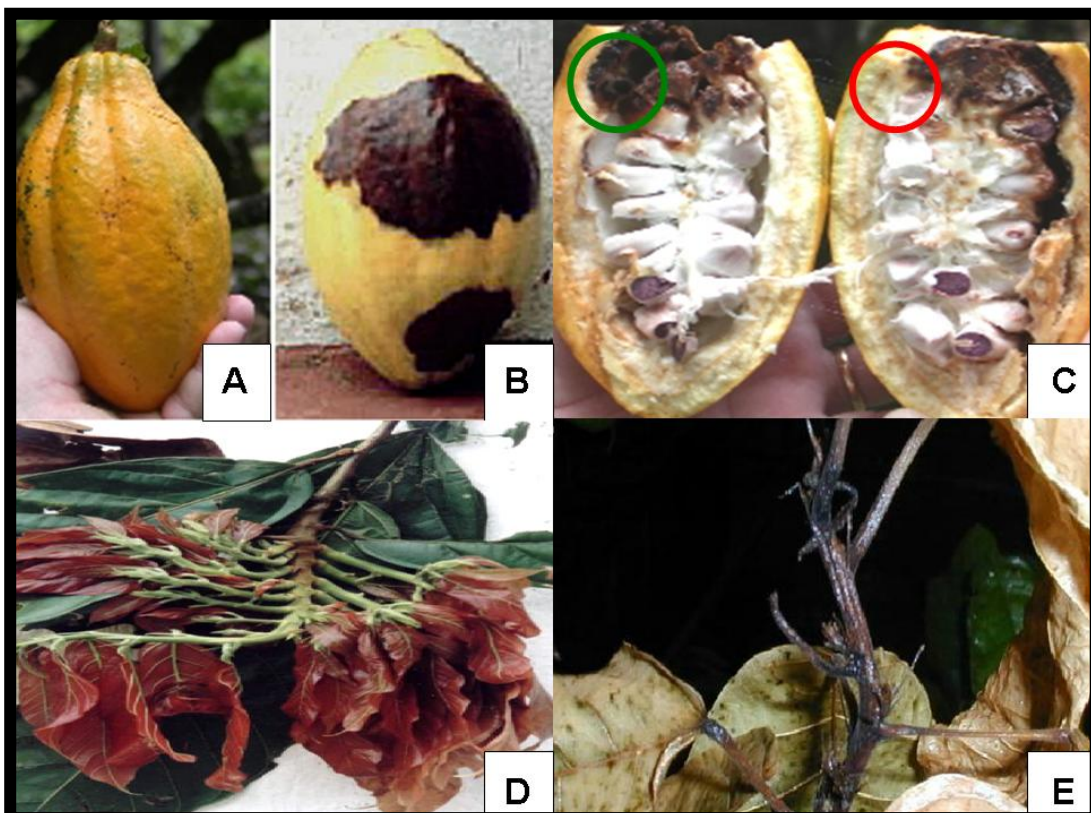


Figura 4. Material vegetal em diferentes estágios da doença. A. Fruto sadio. B. Fruto doente com *M. perniciosa*. C. Fruto doente. O círculo verde representa a parte necrosada e o círculo vermelho a parte doente sem necrose. D. Vassoura verde. E. Vassoura seca.

3.5. Extração do RNA total de meristemas de *Theobroma cacao*

O RNA total do tecido meristemático de *T. cacao* sadio (controle) e o doente (vassoura verde) foram extraídos como descrito por GESTEIRA et al. (2003). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e às alíquotas de 80 mg foram adicionados 1,5 mL de tampão de extração (ácido bórico 0,2M, EDTA 10 mmol.L⁻¹ pH 7,6 , ajustado com Tris base), SDS 25% e β-mercaptoetanol 13,4 mol.L⁻¹,

misturou-se bem, agitando-o em vortex por 10 minutos e centrifugando a 15.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa foi recuperada (cerca de 1 mL), transferida para um novo tubo no qual foi adicionado igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1 (v/v). Em seguida, as amostras foram agitadas por 10 minutos e centrifugadas a 15.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Novamente foi recuperada a fase aquosa (cerca de 0,9 – 1 mL) na qual foi adicionado igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v/v). Posteriormente as amostras foram homogeneizadas por 10 minutos e centrifugadas a 15.000 x g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, foram colhidos 700 µL da fase aquosa, transferidos para um novo tubo e adicionou-se 70 µL de NaAc 3 M pH 4,5 e 308 µL de butanol terciário (0,4 volume) para a eliminação da mucilagem (goma). As amostras foram incubadas em gelo por 30 minutos, sob agitação constante, e após a incubação foram centrifugadas a 15.000 x g por 10 minutos a 4°C, recuperando a fase aquosa por inversão. Ao tubo contendo a fase aquosa foram adicionados 594 µL de butanol terciário (0,6 volume) homogeneizando bastante com o auxílio de vortex e deixando no gelo por 30 minutos. Após 20 minutos de centrifugação a 15.000 x g a 4°C o *pellet* foi lavado com EtOH 70 % gelado, seco a temperatura ambiente por 10 minutos, solubilizado em 50 µL de água milli-Q RNase free e estocado a -80°C.

A quantidade e a qualidade do material extraído, foi verificado através de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio a 0,25 µg.mL⁻¹, visualizado em transiluminador UV (Vilber Loumart) e fotodocumentado em sistema Kodak EDAS 290.

3.6. Testes para a escolha das melhores condições dos PCRs

A padronização das reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi realizada a partir da amplificação dos distintos cDNA de proteases com os *primers* específicos. Para escolher a melhor temperatura de amplificação desses *primers* foi realizada uma reação de PCR com gradiente de temperaturas que variaram de 35,1°C a 45,4°C. Com esse teste, foi possível escolher a melhor temperatura de amplificação que seria utilizada para se trabalhar com o sqRT-PCR que foi a de 45,4°C (Figura 5), baseando-se na temperatura média dos *primers* (Tabela 6). Os fragmentos de proteases foram amplificados utilizando as seguintes condições: 94°C

por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 45 segundos; 45°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto; 72°C por 7 minutos e 15°C continuamente.

Após a determinação das temperaturas ótimas de anelamento, foram feitos testes de especificidade dos *primers* nos diferentes clones de proteases. Cada par de *primers* foi utilizado para amplificar o clone para o qual ele foi bem desenhado (por exemplo, *primers* Ser amplificando o clone Ser utilizado para a escolha dos *primers*) como para amplificar os outros clones de proteases da mesma família (por exemplo, *primers* Ser amplificando um outro clone de serina protease que foi utilizado para a escolha dos *primers*) ou de família diferente (por exemplo, primer Ser amplificando o clone VPE).

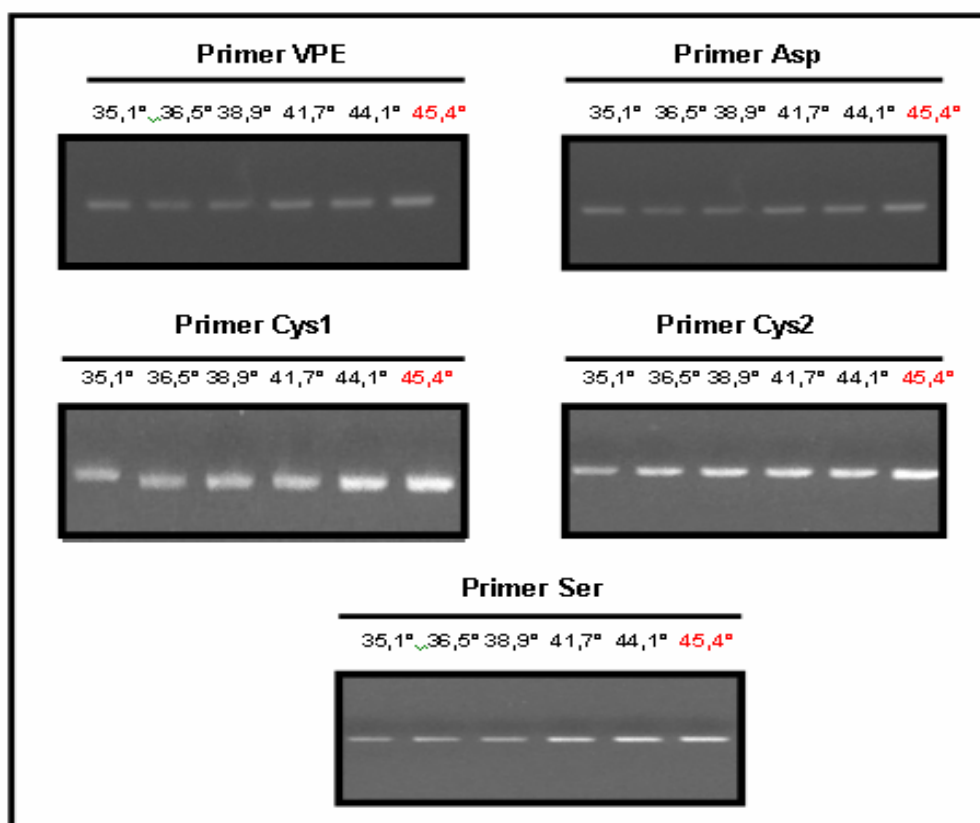


Figura 5. PCR com gradientes de temperaturas. Seis temperaturas (de 35,1°C a 45,4°C) foram testadas para cada um dos cinco *primers*. Em vermelho destaca-se a melhor temperatura de anelamento e que passou a ser utilizada nas reações.

3.7. Análise de expressão gênica por meio de sqRT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction)

As análises por sqRT-PCR foram feitas utilizando o RNA extraído das amostras de meristemas controles e doentes pelo *M. pernicioso*. Aliquotas dos RNAs totais foram tratados com DNase I - RNase Free (Fermentas), de acordo com as recomendações do fabricante (Figura 6). Para conferir a eficiência do tratamento, foi efetuada uma reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando os *primers* 18S-F 5'-CAAGCGATCTTTTCGTAGG-3' e 18S-R 5'-CGAAGATAAAATCCGAGCTTGT-3' específicos do gene codificando a proteína ribossomal 18S de *T. cacao* (gene constitutivo utilizado para normalização do experimento, ver parágrafo abaixo).

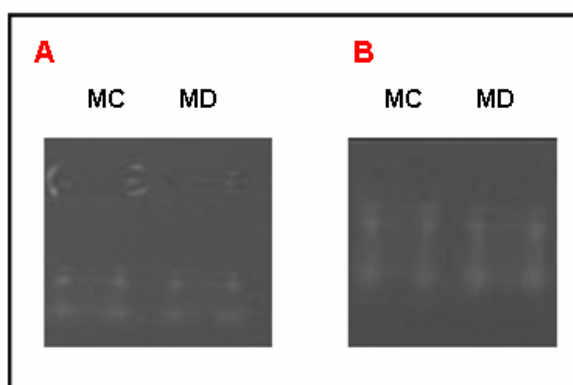


Figura 6. Extração de RNA de meristema de *T. cacao*. Antes (A) e após (B) ao tratamento com DNase. MC: meristema controle; MD: meristema doente.

Após o tratamento com DNase, os RNAs totais foram submetidos a transcrição reversa utilizando a enzima SuperScript™ II (Invitrogen) conforme recomendações do fabricante. A síntese de cDNAs foi realizada utilizando 10 µL de RNA total como molde, 1 µL de inibidor de RNase 40 U (Invitrogen), 1 µL dNTPs Mix (10 mM), 1 µL *primer* oligo dT (2,5 pmol/µL). A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos e imediatamente resfriada no gelo. Adicionou-se 4 µL de 5X First Strand Buffer, 2 µL DTT 0,1 M. As amostras foram incubadas por 2 minutos a 42°C e em seguida adicionou-se 1 µL de SuperScript™ II (200 U). Incubou-se por 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 42°C e 15 minutos a 70°C para inativar as enzimas. Após adição

de 1 µL RNase H (5U), a reação foi incubada por 20 minutos a 37°C, para a degradação das fitas de mRNA híbridos, mRNA:cDNA ainda existentes. O cDNA confeccionado foi armazenado a -20°C.

Com a intuito de padronizar a técnica de RT-PCR foram realizadas amplificações dos cDNAs utilizando *primers* específicos para o gene iniciador da proteína ribossomal 18S do *T. cacao* (18S-F 5-CAAGCGATCTTTTCGTAGG-3' e 18S-R 5'-CGAAGATAAAATCCGAGCTTGT-3').

Os volumes de cDNAs necessários para a correta análise semi-quantitativa da expressão dos genes de proteases, durante os diferentes estágios da vassoura-de-bruxa no cacauzeiro, foram determinados pela análise densitométrica dos genes do 18S utilizando o software Kodak Digital Science™ ID Image Analysis.

Os produtos da transcrição reversa (cDNAs) foram amplificados por meio de PCR e separados em gel de agarose 2,5 %, corado com brometo de etídio a 0,25 µg.mL⁻¹. As bandas foram visualizadas sobre luz ultravioleta, fotodocumentadas pelo sistema Kodak EDAS 290 e analisadas por densitometria utilizando o software Kodak Digital Science™ ID Image Analysis.

A normalização da expressão dos genes de proteases de *T. cacao* foi realizada a partir dos dados da análise densitométrica do gene 18S, gerados em pixels, baseado na área das bandas fotodocumentadas. O valor referente à banda que corresponde a menor expressão do 18S foi dividido pelos demais valores referentes à expressão do 18S nas diferentes fases. O resultado obtido foi utilizado como coeficiente de erro. O coeficiente de erro encontrado na expressão do 18S de uma determinada fase foi então multiplicado pelos valores gerados com a expressão dos demais genes nesta mesma fase, estimando assim a legítima expressão gênica.

3.8. Cultivo de *Moniliophthora perniciosa*

O *Moniliophthora perniciosa* foi inoculado e cultivado em meio de cultura mineral sólido composto por glicose 1% (p/v), NH₄H₂PO₄ 0,1% (p/v), KCl 0,02% (p/v), MgSO₄.7H₂O 0,02% (p/v), CuSO₄.5 H₂O 0,001% (p/v), ZnSO₄.7H₂O 0,001% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v) e ágar 1,5% (p/v). Após a inoculação o fitopatógeno foi cultivado por 15 dias a 25°C. O fitopatógeno foi transferido para meio mineral líquido contendo glicose 1% (p/v), NH₄H₂PO₄ 0,1% (p/v), KCl 0,02%

(p/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02% (p/v), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,001% (p/v), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), também estéril e incubado sem agitação por 10 a 15 dias. Após o período de incubação, o micélio cultivado foi utilizado para extração de proteínas totais.

3.9. Extração de proteínas fungicas totais

A extração das proteínas do micélio foi realizada em condições nativas de acordo com MICHELI et al. (2000). A amostra foi macerada com nitrogênio líquido e pesada na proporção de 1g do material macerado para 3 mL do tampão de extração (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 com 1% de Triton X-100). Em seguida, a amostra foi agitada no vortex durante 10 minutos para misturar completamente o macerado com o tampão e depois colocada imediatamente no gelo. Esse extrato foi deixado no gelo por uma hora, sendo vortexado a cada 10 minutos. Depois desse período o extrato foi centrifugado durante 20 minutos a 15.000 x g a 4°C, e o sobrenadante foi recuperado e estocado em geladeira, para posteriores experimentos.

3.10. Extração de proteínas totais de *Theobroma cacao*

A extração das proteínas do material vegetal (meristemas e frutos) de *T. cacao* nas diferentes fases da doença, foi realizada em condições nativas de acordo com MICHELI et al. (2000) com modificações. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e pesadas na proporção de 1 g do material macerado para 5 mL do tampão de extração (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 com 1% de Triton X-100). Em seguida, as amostras foram agitadas no vortex durante 10 minutos para que o pó fosse completamente misturado com o tampão e depois colocadas imediatamente no gelo. Esse extrato foi sonicado (8 pulsos de 3 segundos com amplitude de 70%) utilizando o aparelho Ultrasonic Processor GEX 130, deixando-o sempre no gelo, e depois centrifugado durante 20 minutos a 15.000 x g a 4°C. O sobrenadante foi recuperado com o cuidado de não se coletar a mucilagem (goma). Ao *pellet* foram adicionados 5 mL do tampão de extração, deixando o tubo sempre no gelo. As amostras foram vortexadas por 10 minutos para ressuspendê-las, e sonicadas

novamente. Em seguida, elas foram centrifugadas por 20 minutos a 15.000 x g a 4°C, o sobrenadante foi recuperado e adicionou-se 0.4 volume de butanol terciário e 1/10 de NaAc 3 M pH 4.5. As amostras foram colocadas no gelo por 30 minutos agitando a cada 10 minutos, centrifugadas por 10 minutos a 15.000 x g a 4°C, e o sobrenadante de cada amostra foi recuperado e estocado em geladeira, para posteriores experimentos.

3.11. Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese dos extratos protéicos de meristemas e frutos de *T. cacao*, nas diferentes fases da doença, foi realizada em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes 12,5% (SDS-PAGE). O gel de separação foi composto por água mili-Q, tampão de baixo 4X (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8), acrilamida 30%, persulfato de amônio 1% e TEMED; o gel de empilhamento 5% foi composto por água mili-Q, tampão de cima 4X (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8), acrilamida 30%, persulfato de amônio 1% e TEMED. A corrida eletroforética ocorreu a 160 V, 280 mA e 60 W, no equipamento Mini-Protean da Bio-Rad de acordo com as instruções do fornecedor. Após o período da corrida, o gel foi fixado por 30 minutos numa solução contendo ácido acético a 10% e etanol a 40%. Os géis foram corados com *coomassie* coloidal G 250 a 5%, e descorados com água destilada. Por fim os géis foram fotodocumentados em sistema Kodak EDAS 290.

3.12. Gel de atividade proteolítica

O procedimento foi realizado de acordo com a metodologia modificada de WANG et al. (2004) e DISTEFANO et al. (1997). As amostras dos extratos protéicos de meristemas e frutos de *T. cacao*, nas diferentes fases da doença foram adicionadas ao tampão de amostra 6X (glicerol 60%, azul de bromofenol 0,4% e Tris-HCl 0,5 M pH 6,8) na proporção de 5 µL do tampão para cada 20 µL da proteína. As amostras foram aplicadas ao gel de poliacrilamida nativo 12% (sem SDS), contendo caseína (copolimerizada) 1% no gel de separação. A corrida eletroforética ocorreu a 160 V, 250 mA e 60 W em ambiente refrigerado. O gel foi

lavado com Triton X-100 por 30 minutos em temperatura ambiente e incubado nos seguintes tampões: fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0; tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 com cisteína 2 mM; acetato de sódio 0,1 M pH 4,0; acetato de sódio 0,1 M pH 4,0 com DTT 10 mM; acetato de sódio 0,1 M pH 4,0 com cisteína 2mM, nas temperaturas de 37 e 40°C, por 20 horas. Os géis foram fixados por 30 minutos numa solução contendo ácido acético a 10% e etanol a 40%. A coloração dos géis foi realizada com o *coomassie* coloidal G 250 a 5%, e descorados com água destilada. Em seguida os géis foram fotodocumentados como descrito previamente.

4. RESULTADOS

4.1. Análise de seqüências de proteases de *Theobroma cacao*

Durante o re-sequenciamento dos clones selecionados nas bibliotecas de ESTs da interação compatível e incompatível de *T. cacao*-*M. pernicioso* foram confirmadas 22 seqüências (*reads*) de genes expressos com similaridade com classes de cisteína, serina e aspártico proteases. Na biblioteca da interação resistente (TSH) foram identificadas quatro seqüências de aspártico, quatro de cisteína e cinco de serina proteases, e na biblioteca suscetível (Catongo) foram identificadas três seqüências de aspártico e seis de cisteína proteases. Entre as cisteínas proteases foram identificadas duas seqüências de VPE (*Vacuolar Processing Enzyme*) uma em cada biblioteca.

O alinhamento destas seqüências permitiu a formação de nove seqüências complementares (*Forward* e *Reverse*). Nenhuma dessas seqüências formadas representou um gene de protease inteiro. Essas seqüências possuíam em média 545 pb, com quatro dessas seqüências foram desenhados os primers (Asp, Ser, Cys1 e VPE), e o quinto *primer* (Cys2) foi desenhado de uma seqüência de cisteína não complementar. As seqüências nucleotídicas dos *primers* foram alinhadas para confirmar a sua especificidade (Figura 7).



Figura 7. Alinhamento nucleotídico entre as seqüências de proteases para as quais primers específicos foram desenhados. Cada cor representa uma seqüência forward e reverse dos respectivos primers.

Essas cinco seqüências de proteases foram traduzidas e apresentaram a seguinte quantidade de aminoácidos: Asp (405), Ser (360), VPE (375), Cys1(355) e Cys2 (373), em seguida essas seqüências foram alinhadas por famílias com seqüências de proteases de outras espécies de plantas já depositadas em banco de dados público GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) utilizando o programa BLASTX (Figuras 8, 9, 10, 11 e 12).

```

T.cacao .....
S.aurantiaca ...RRLSLLLLSSSALLLLAAA... SEDPVIRQVVS... DDQQLLSAEHHF'SFLSRYGKSYADEAEHAYRFSVFKSNLRRAR
P.terminalis MDLLSRFVLLLFSSSLVF AATASTVSDSDLLIRQVWAGADDHDNDLLNAAEHF'SFKKRF GKRYTSCDEHRRFVFKANLRRAK
I.batatas MDRFSLP SLLIHALTAACVVR A..... DEDPLIRQVVS D... GEDDALLNADHHTLFKSKYGKSYATQEEHDYRLSVFKANLRRAK

T.cacao RRTTERSDSVRGSGRITSYSIHYTKLSVDGTGH.....MPGNSAITAGGIWIMGVGLLVGYGSAGYAPIR.FKEKPYWI IKN SWGEN
S.aurantiaca RHQRDP TAVHGVTRFADLT PSEFRRTYLGLRR.....RPRTAGSTHDAPILPTNELPADFDWRDHGAVTPVKNQGS CGSCW SF SAA
P.terminalis RNQILDPSAVHGVTRFADLT PSEFRRTYLGLKR.....L.RLPADTHEAPILPTNDLPADFDWRDHGAVTPVKNQGS CGSCW SF SAT
I.batatas RHQMLDPSAVHGVTRFADLT PSEFRRTYLGIKSSSSKQK LKLPADAHAAEILPTSDLPDFEWRDYGAVTGVDQGLCGSCW SF STT

T.cacao YGEEGYKICRGRNVC.GVDSMVSVLPCQKSHSRFSSILSRGNLHIFPDL CQYLRLHL LVL ETEYP I R G. . .GVCRYMERGTGRKNFV
S.aurantiaca GALEGANFLSTGNLVSLEQLVD CDHVCDSSEP..DSCDQCGNGGLMTTAF EYTLKSGGLEREADY P Y T G T D R G T C K F N K A K I S A V A S N
P.terminalis GALEGANFLATGKLVSLSEQQLVD CDHVCDSSEP..SSCDSGCNGGLMTTAF EYTLKAGGLEREEDY P Y T G T D H S K C K F D K T K I A V S A S N
I.batatas GTLEGTNFLATGELLSLNEQELVD CDHLCDPKKA..GACDAGCNGGLMTTAYEYVLQSGGLEKEKDY P Y T G R D . G T C K F D K S K I A A A V A N

T.cacao HTLYRKLSSQTVTRDIWPGNSAITGPGGIWIMGCFLGMFC SY.....AP IRFKEKPYWI IKN SWGENWGE EGY
S.aurantiaca FSVVSDIEDQI AANLVKHGPLAV.GINAVFMQTYVGGVSPYICGKHL.DHGVLLVGYGSAGF AP IRFKEKPYWI IKN SWGENWGENGY
P.terminalis FSVVSLDENQI AANLVTHGPLAI.GINAVFMQTYVGGVSPYICSKRLLDHGVLLVGYGSAGF AP IRFKEKPYWI IKN SWGESWGEKGY
I.batatas FSVVSLDEDQI AANLVKHGPLSV.GINSIFMQTYVGGVSPYICSKKRLDHGVLLVGYGAGY AP IRFKDKPYWI IKN SWGENWGE EGY

T.cacao KICRGRNVCVDSMVSVVAALQTKSQIFFVNIKIMQLTYISRFMPVLKTF AFALAGNVPDRGGV CRLVNSCVL IKTSGMHLMFTYIYK G
S.aurantiaca KICRGRNVCVDSMVSVSAFHTSH.....
P.terminalis KICRGRNICGDSMVSVVAAPPTVN.....
I.batatas KICRGNVICVDSMVSVTAASITIKQ.....

T.cacao CPKWKKKKKKKKKKTCRPPRPSRFLD
S.aurantiaca .....
P.terminalis .....
I.batatas .....

```

Figura 8. Alinhamento protéico entre a seqüência proteolítica Cys1 de *T. cacao* e as seqüências de cisteína protease de *Sandersonia aurantiaca*, *Ipomoea batatas* e *Pachysandra terminalis*. Em vermelho estão representadas as regiões conservadas entre as seqüências.

T. cacao
C. cinensis	HTRLASGVLLITLLVLLAGIADGSRDLAGDILKLPSEAYRFFHNGGGGAKVYRHQADI CHAYQLLRKGGLKDEMIIVE
G. max	HPTEFLPTLLLLLLEAFRTS VSGRRDLVGDFLRLPSET..... YRHQADVCHAYQILRKGGLKDEMIIVE
N. tabacum	HTSYRAGIEFFLVGFSTAAADGR..... NVLLKLPSEASRFF..... YRHQADVCHAYQLLRKGGLKDEMIIVE
T. cacao
C. cinensis	NDDDD SVGTRWA VLLAGSN GFWNHYDDIAFNE ENPRPGVIIHHPH GDDVYKGVPKDYTG EDVTVKFFAVVL GNMKA
G. max	DNDDNFKGTREWA VLLAGSN GFWNHYDDIAFNG ENPRPGVIIINKPD GGDVYKGVPKDYTG EDVTVDFEFAALL GNMKA
N. tabacum	DEADD SVGTRWA VLLAGSN GFWNHYDDIAFNE ENPRPGVIIINSPA GEDVYKGVPKDYTG DDDVNVVD NELAVLL GNMKA
T. cacao
C. cinensis	LTGGS GKVVDS GPNDRIEIFYSDHG GPVGLGHPTSRITYADELID VLKKGKRA SGMYSKLV EYFLER CESGSIFF EGLLL
G. max	LTGGS GKVVDS GPDDHIFVYTDHG GPVGLGHPA GPPLYADDLIE VLKKGKRA SGTYSKLV EYFLER CESGSIFF EGLLP
N. tabacum	LTGGS GKVVDS GPNDRIEIFYSDHG GPVGLGHPTNPLYASDLID VLKKGKRA SGTYSKLV EYFLER CESGSIFF EGLLP
T. cacao	AAERP SRA SQRKRPHEVHTLYEVI SRRYRT YAREF GHYGRGDKYRKAPDGS VREKLEA QKQF... VEAS HHHHI
C. cinensis	EGLNI YATTASNAEES SWGTYCPGEIP GPPE YSTCLGDLYSLAWHEDSDIHMLETETLHQ QYELVKTRTAS YNSY
G. max	EDINI YATTASNAEES SWGTYCPGEYFSPPEYTTCLGDLYSVRWHEHSDRHMLETETLHQ QYELVKERTIS GDSYY
N. tabacum	KGLNI YATTASNAEES SWGTYCPGDYFSLPPGYETCLGDLYAVSWHEDSEHMLETENLRQ QYELVKERTAN GMSAY
T. cacao	DNSHKLI GKLEF GIEKQPEVHEKTVRPAQQLVDDWKCLKKHVRTTFETHCGSLAQYGHKHHRS LANI CMA GI QTE QMA
C. cinensis	GSHVHQY GDI GL SKNMLFT YLGNPANDNFTF VDENS LRPA SKAVNQDADL LHEFWDKFRKAPG ETPRKA EA QKQF
G. max	GSHVHQY GDVGL SRDVLVFLHYL GTPANDNFTF VDENS LWSP SKPVNQDADL LHEFWDKFRKAPG ETLRKA EA QKQV
N. tabacum	GSHVL QF GDLQL GHD SLFHYHGTNPANDNFTYVDDNS LRAS SKAVNQDADL LHEFWDKFRKAPG E SARKVEA QKQF
T. cacao	EA SAQACVSIPS GHWSVQKGFSAIQQNRQYRPNPWLAGQPLVDDWKCLKKHVRTTFETHCGSLAQYGHKHHRS LANI
C. cinensis	EAHSHRHVVDS... IKLIGKLLFGIEKGPEILNTVRPAQQLVDDWGLKSLVRTFETHCGSLAQYGHKHHRS LANI
G. max	EAHSHRHVVDS... VKLIGKLLFGIEKGPEVLMAVRPAQSA LVDDWHCLKTHVRTFETHCGSLAQYGHKHHRS LANI
N. tabacum	EAHSHRHVLDNS... HRLVIGKLLFGIQKGPEVLKRVRPVGQPLVDDWTCLKYFVRTFETHCGSLAQYGHKHHRS LANI
T. cacao	CMA GI QTE QHREASQAQCVSIPS GHWSVQKGFSAIQQNRQYRPNLGLCCTPQCGLSYRLSKRCIYHIVNVVIRCVK
C. cinensis	CMTGI GKEKHAEASQAQCEMIPSGPWSLDRGFSA.....
G. max	CNVGIGKNEQHREASQAQCVSIPSNPWSLDRGFSA.....
N. tabacum	CMA GIKHEQHVEASTQAQCP SVPTNIWSSLHRGFSA.....
T. cacao	LFESM SVPDCLI VYASDVS VCILYE SFPICVIEWIRKFLRKKKKKKKKKT CRP PEP SRSF LDHSLRAR
C. cinensis
G. max
N. tabacum

Figura 9. Alinhamento protéico entre a seqüência proteolítica VPE de *T. cacao* e as seqüências de VPEs de *Citrus sinensis*, *Glycine max* e *Nicotiana tabacum*. Em vermelho estão representadas as regiões conservadas entre as seqüências. O box em azul representa uma díade catalítica (His-Cys) presente nas cisteínas proteases.

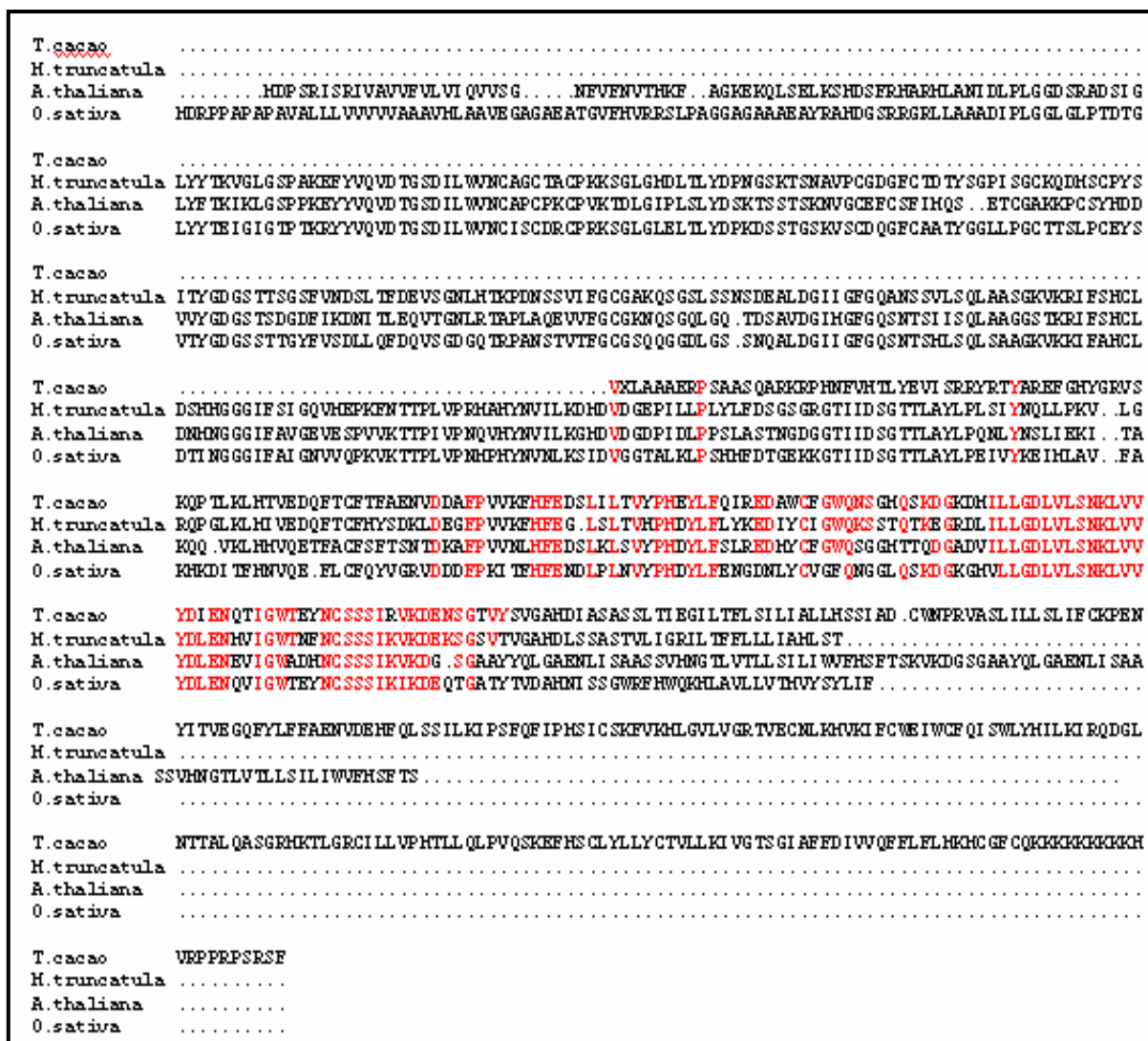


Figura 10. Alinhamento protéico entre a seqüência proteolítica Asp de *T. cacao* e as seqüências de aspártico protease de *Medicago truncatula*, *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*. Em vermelho estão representadas as regiões conservadas entre as seqüências.

T.cacaoXXGGIASKPLILSKRVKIPPTLVPLLHLRSLLPFV
H.brasiliensisMFMLLFFASTLSSASDLISISYDQSHGTKSSWRTDDEVMAIYEDWLVKHGKAYNSLGEKERRFEVFKDNLRFIDEHNS.ENR
M.esculenta	MMGLFGSSAMFVLLFLSFTLSSASDMSIISYDQTHATKSSWRTDDEVMAIYEEWLKQGVYNALGEREKRFQVFKDNLRFIDEHNS.ENR
L.esculentum	MAAHSSTLTISILLMLIFSTLSSASDMSIISYDETHHR...RTDDEVSALESWLIHCKSYNALGEKDKRFQIFKDLRYTDEQNSVFNQ
T.cacao	IVITPALKAIIPAAVSTSTMTALLGDAATRGSTCCDDHYSCCPHEYPICNINEGTCLMSKGNPLGVKALRRTPAKPFWAHGSVGGKSNVVA
H.brasiliensis	TYRVGLNRF..ADLTNEEYRSMYLGALSGIRRNKLRKI.SDRYTPRVGDSLPSVDWRKEGAVVGVKQDQSGSCWAFSAVAAVEGINKIVT
M.esculenta	TYKLGNGF..ADLTNEEYRSTYLGARGGMKRNLRKT.SDRYAPRVGESLPSVDWRKEGAVAEVKDQDQSGSCWAFSTIAAVEGINKIVT
L.esculentum	SYKLGKTKF..ADLTNEEYRSIYLGTKSSGDRKKLSKNKSDRYLPKVGDSPESIDWREKGVLVGVKQDQSGSCWAFSAVAMESSINAVIT
T.cacao	WILSSSID...VKGEGMKRHGFDGAQWFLPWVFTVLQSFSLNFIKELMVYH...SYSR...PVGESNNTCPLKQYPACLCLTSTMAT
H.brasiliensis	GDLISLSEQELVDCDN SYNEGCHGGLMDYGFETIINNGIDSEEDYPYLARDGRCDTYRKNARVVSIDSIEDVPVNNKALQKAVANQPVS
M.esculenta	GDLISLSEQELVDCDT SYNEGCHGGLMDYAFETIINNGIDTEEDYPYLARDGRCDTYRKNAKVVTIDDYEDVPVNSEALQKAVANQPVS
L.esculentum	GNLISLSEQELVDCDR SYNEGCHGGLMDYAFETVIKNGGIDTEEDYPYKERNVCDQYRKNAKVVKIDSIEDVPVNNKALQKAVAHQPVS
T.cacao	ACLGLPTRGSHLLRPLQLLPSLNTQSATNKAPAAARATHWRLGALLPHL.....SGHMEVAKRAMLKWPGIFKQMLKGGKTGRWRSMF
H.brasiliensis	VAIER.GGRDFQLYSSGVFSGRCGTALDHGVVAVGYGTENGQDYWIVRNSWGKSWGEGYLRLA.RNIRKPTGICGIAMEASYPIKKGQNP
M.esculenta	VAIER.GGRDFQFYASGIFSGRCGTQLDHGVAAVGYGTENGKDYWIVRNSWGKSWGEGYLRLA.RSINSPPTGICGIAMEASYPIKKGQNP
L.esculentum	IALER.GGRDFQHYKSGIFTGKCGTAVDHGVVIAGYGTENGMDYWIVRNSWGAWGEGYLRLVQ.RNVASSSLCGLAIEPSYPVKTGPNP
T.cacao	LS..MLHWGNRQNAANFYCSLFISSFSNMFELNCRKKKKKKKKNM.....
H.brasiliensis	YANFCFEWGCPCLEGATCCDHYSCCPHDYPICNVNQGTCCLMSKDNPLGVKAIIRTRAKPHWALGAEKKSST
M.esculenta	YGNFCFEWGCPCLEGATCCDHYSCCPHDYPICNVNQGTCCLMSKDNPLAVKAMIRIPAKPHWALGAAKKSSTA
L.esculentum	FRRSCFSWGCPCLEGATCCDHYSCCPHDYPICNVNQGTCCLMSKGNPLGVKAMKRILAQPIGAFGNGKKSST

Figura 11. Alinhamento protéico entre a seqüência proteolítica Cys2 de *T. cacao* e as seqüências de cisteína protease de *Hevea brasiliensis*, *Manihot esculenta* e *Lycopersicon esculentum*. Em vermelho estão representadas as regiões conservadas entre as seqüências.

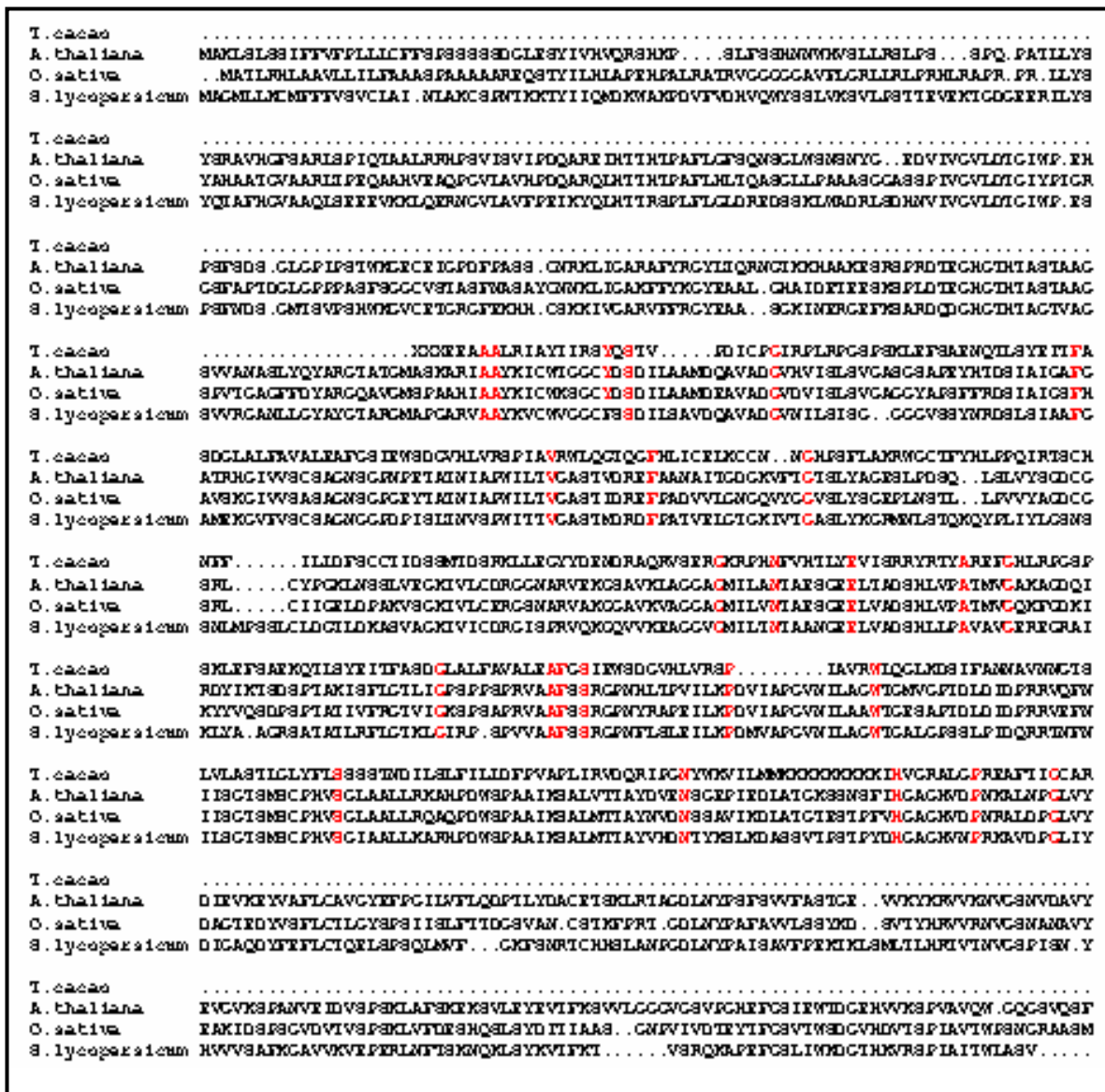


Figura 12. Alinhamento protéico entre a seqüência proteolítica Ser de *T. cacao* e as seqüências de serina protease de *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* e *Solanum lycopersicum*. Em vermelho estão representadas as regiões conservadas entre as seqüências.

O alinhamento confirmou a similaridade entre as seqüências de proteases de *T. cacao* com as demais espécies vegetais demonstrando a presença de regiões conservadas, sendo que as seqüências proteolíticas em relação às seqüências de Asp e Ser (proteases). A maior similaridade ocorreu entre Cys1 de *T. cacao* e a cisteína protease de *Ipomoea batatas* que apresentaram uma similaridade de 90% e a menor ocorreu entre a Ser de *T. cacao* e a serina protease de *Solanum lycopersicum* com 45% (Tabela 7).

Tabela 7. Similaridade de seqüências de aminoácidos de proteases de *T.cacao* com proteases de diferentes espécies vegetais. Em vermelho destaca-se a maior similaridade observada entre a cisteína-1 (protease) de *T. cacao* com a cisteína protease de *I. batatas*; em azul a menor similaridade que foi vista entre as serinas proteases de *T. cacao* e *S. lycopersicum*.

Proteases de <i>T. cacao</i>	Outras espécies vegetais	Nº de acesso	Similaridades (%)
VPE	<i>Citrus sinensis</i>	P49043	80
	<i>Glycine max</i>	AAL58570.1	80
	<i>Nicotiana tabacum</i>	BAC54830.1	77
Cys1	<i>Sandersonia aurantiaca</i>	AAL05851	88
	<i>Ipomoea batatas</i>	AAQ81938	90
	<i>Pachysandra terminalis</i>	ABF46642.1	89
Cys2	<i>Hevea brasiliensis</i>	ABG33750.1	79
	<i>Manihot esculenta</i>	AAX84673.1	74
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AAD48496.1	67
Asp	<i>Medicago truncatula</i>	ABE89788.1	63
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP198475	59
	<i>Oryza sativa</i>	CAE01597	58
Ser	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_566473	55
	<i>Oryza sativa</i>	NP_001048301	54
	<i>Solanum lycopersicum</i>	CAA67430	45

O alinhamento protéico entre as seqüências de Asp de *T. cacao* com as de *Medicago truncatula*, *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*; de Ser com *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* e *Solanum lycopersicum*; Cys1 com *Sandersonia aurantiaca*, *Ipomoea batatas* e *Pachysandra terminalis*; Cys2 com *Hevea brasiliensis*, *Manihot esculenta* e *Lycopersicon esculentum*; e VPE com *Citrus sinensis*, *Glycine max* e *Nicotiana tabacum*, permitiu a montagem de um cladograma através do programa ClustalW, o que confirmou a similaridade e o agrupamento filogenético entre essas famílias de proteases (Figura 13).

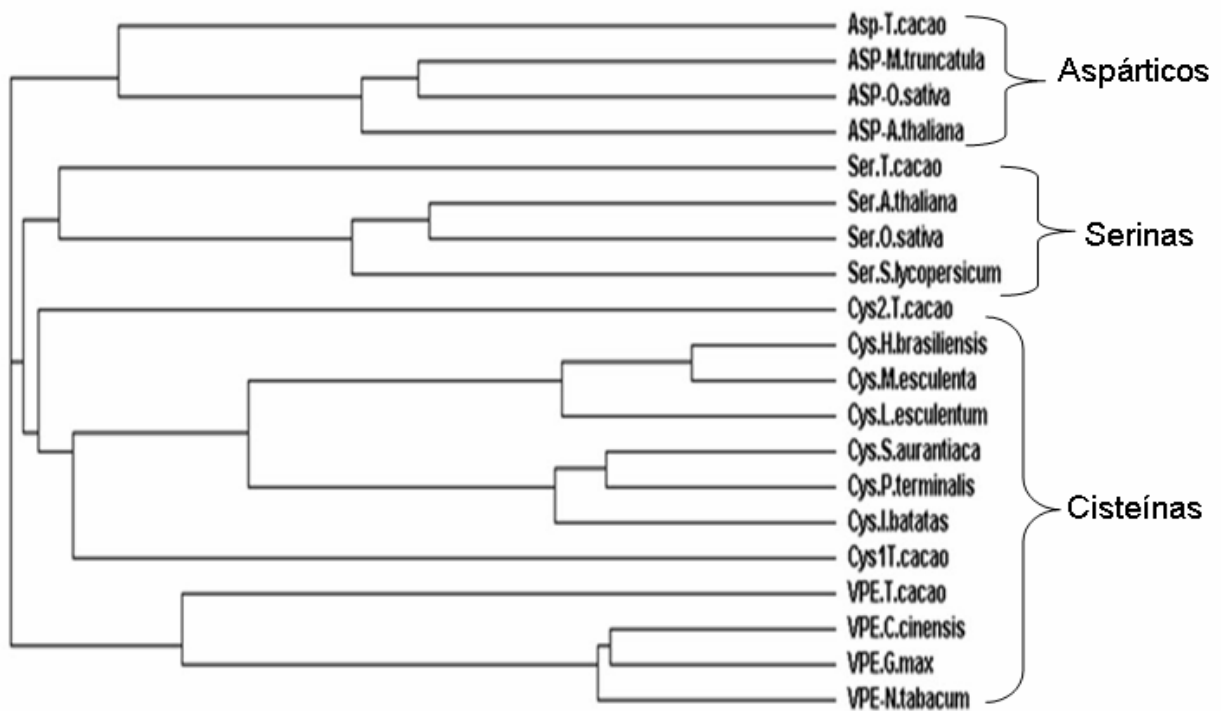


Figura 13. Cladograma mostrando o agrupamento filogenético baseado na similaridade e na distância das seqüências das diferentes classes de proteases de *T. cacao* e demais espécies vegetais.

4.2. Análise preliminar ao estudo da expressão gênica por meio de sqRT-PCR de proteases de *Theobroma cacao*

4.2.1. Teste de especificidade dos *primers* entre classes de proteases

Reações de PCR entre os distintos cDNAs de proteases com os *primers* específicos foram realizadas, com o intuito de demonstrar que os *primers* desenhados eram realmente específicos. Com esse teste foi possível confirmar a especificidade dos mesmos, pois ocorreu amplificação exclusiva dos cDNAs na presença dos *primers* que os fazem correspondência, confirmado também pelo número de pares de bases de cada um dos fragmentos amplificados (Figura 14).

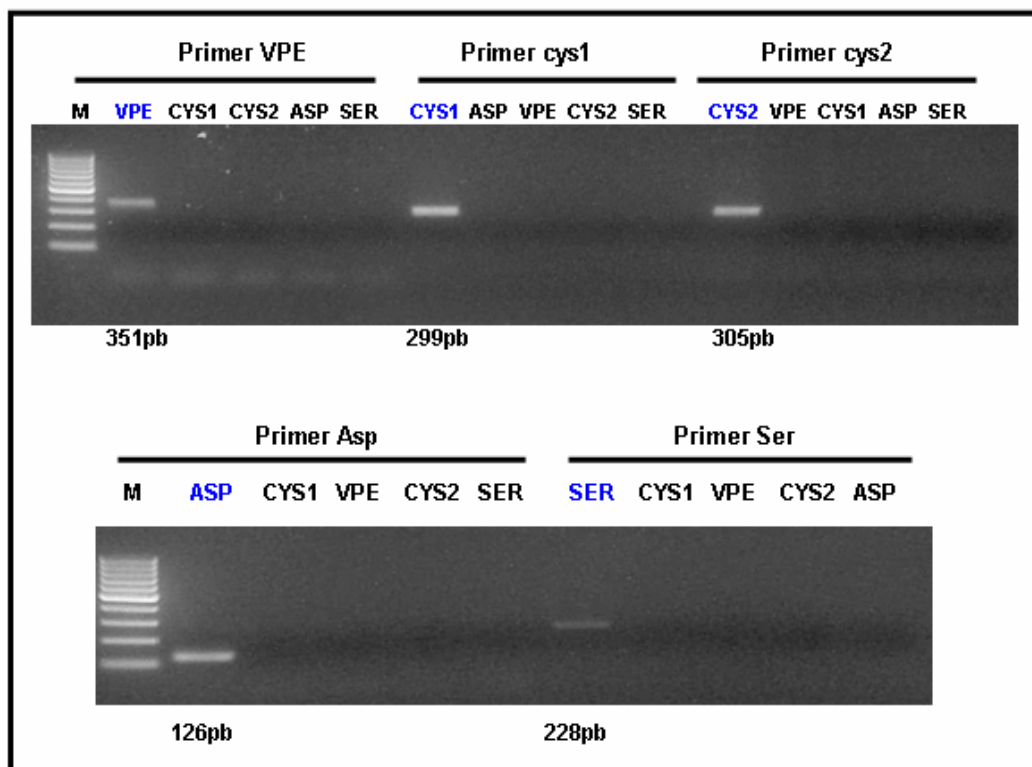


Figura 14. Amplificação dos cDNAs de proteases de diferentes subgrupos com os *primers* específicos. M = marcador ladder 100 pb. Em azul destaca-se a amplificação exclusiva referente a cada dupla cDNA-*primer* específico, confirmada pelo número de pares de bases do fragmento amplificado.

4.2.2. Teste de especificidade dos *primers* entre genes da mesma classe de proteases

No teste anterior foi possível confirmar que os *primers* eram específicos quando foram comparados com genes de diferentes classes de proteases (Figura 14), porém era necessário saber se esses *primers* também eram específicos quando comparados com genes da mesma classe. Com esse teste também foi possível confirmar a especificidade dos mesmos, pois ocorreu amplificação exclusiva dos cDNAs na presença dos distintos *primers* (Figura 15).

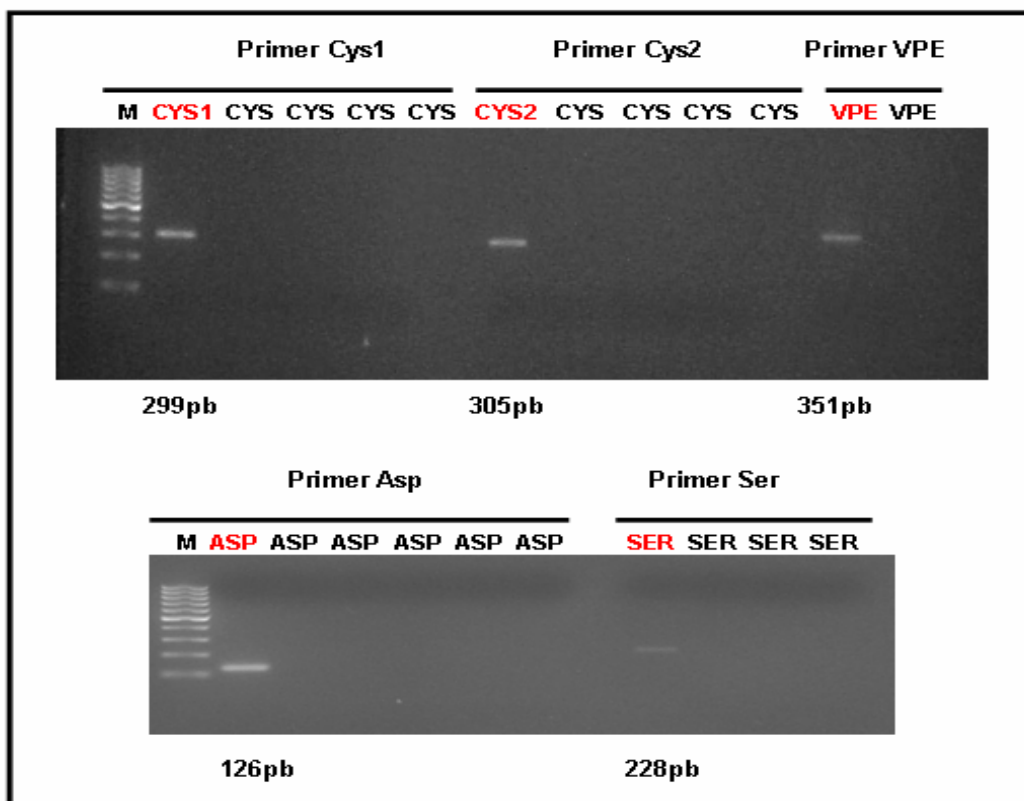


Figura 15. Amplificação dos cDNAs de proteases pertencentes ao mesmo subgrupo com os *primers* específicos. M = marcador ladder 100 pb. Em vermelho destaca-se a amplificação exclusiva referente a cada dupla cDNA-*primer* específico, confirmada também pelo número de pares de bases do fragmento amplificado.

4.3. Análise da expressão gênica de proteases de *T. cacao* em meristemas infectados por *Moniliophthora perniciosa*

Após normalização das amostras de cDNA do meristema controle e o meristema doente com o gene 18S (Figura 16), foram realizadas as amplificações dos cDNAs com os *primers* específicos para os distintos genes de proteases de *T. cacao*, utilizando o cDNA de cada material vegetal na mesma quantidade em que foi utilizado para a normalização com o 18S. Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose revelando a expressão semi-quantitativa desses genes (Figura 16). Para os genes *CYS1*, *CYS2* e *ASP*, foi

observada uma banda em todas as fases estudadas da interação (meristema controle e meristema doente). Essas bandas foram do tamanho esperado: 299 pb, 305 pb e 126 pb, para os genes *CYS1*, *CYS2* e *ASP*, respectivamente. Para os genes *CYS1* e *CYS2*, observou-se que a intensidade das bandas foi menor no meristema controle que no meristema doente. Ao contrário, para o gene *ASP*, observou-se que a intensidade da banda foi um pouco mais forte no meristema controle do que no meristema doente (Figura 16). A análise por densitometria dos produtos de PCR confirma que a expressão de *CYS1* e *CYS2* aumenta durante a infecção enquanto a expressão de *ASP* foi maior no meristema sadio (Figura 17).

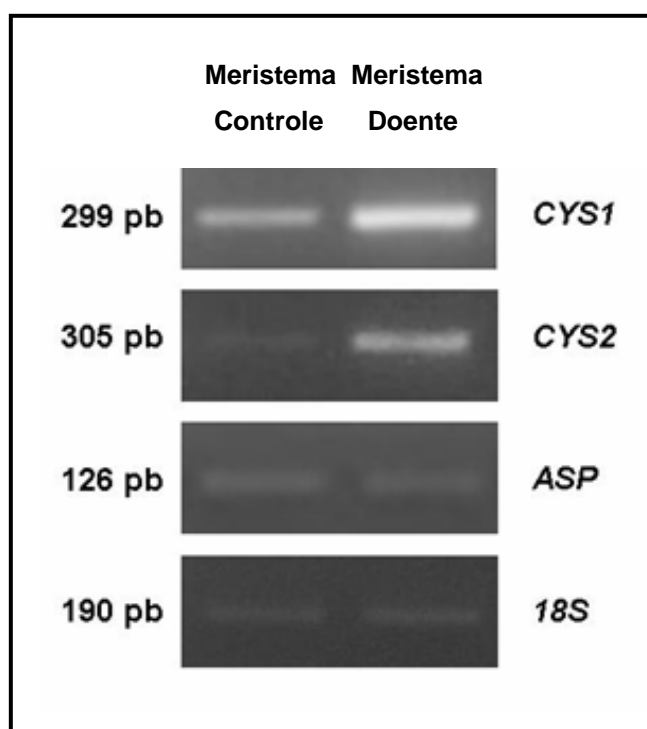


Figura 16. Expressão gênica semi-quantitativa de proteases em meristema controle e meristema doente. A quantidade de cDNA utilizada para a amplificação dos genes *CYS1*, *CYS2* e *ASP* foi normalizada pela análise em pixels do gene *18S*.

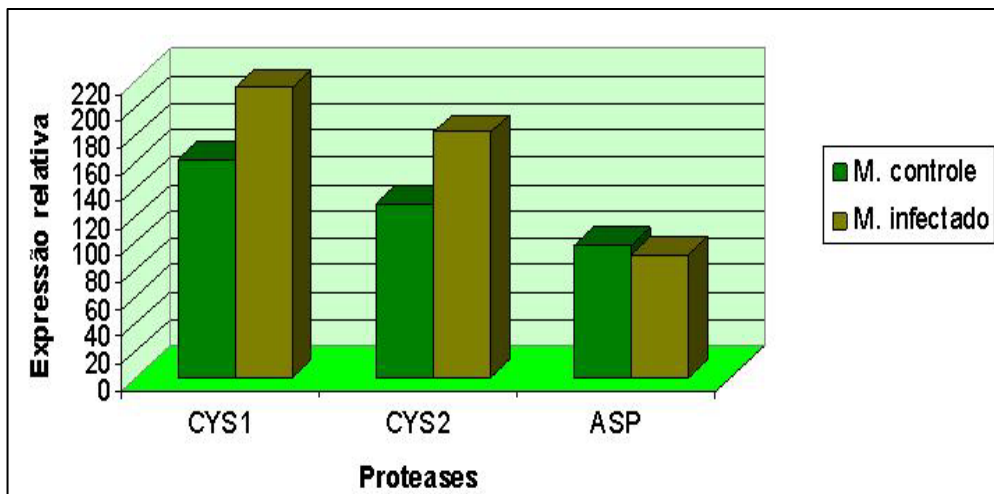


Figura 17. Expressão relativa das proteases de *T. cacao* normalizadas pela expressão do 18S.

4.4. Estudo da atividade de proteases de *Theobroma cacao*

4.4.1. Extração de proteínas totais

As proteínas totais do fruto e meristema de *T. cacao* em diferentes fases do desenvolvimento (fruto sadio, doente e necrosado (endocarpo), meristema sadio, vassoura verde e seca) foram extraídas com o intuito de realizar os testes de atividade proteolítica. Amostras de sementes de cacau foram utilizadas como controle positivo, pois em testes realizados anteriormente foi verificado que a atividade proteolítica funcionava bem com esse material vegetal (comunicação pessoal, Dr. J. Cascardo). Proteínas totais de micélios de *M. pernicioso* também foram extraídas e testadas juntamente com as demais amostras.

Os extratos protéicos dos frutos e meristemas (sadios e doentes) não apresentaram uma concentração muito alta devido à necessidade de utilizar um grande volume de tampão durante a extração para conseguir homogeneizar o material vegetal rico em polissacarídeos (mucilagem). Esses polissacarídeos, presentes em grande quantidade nos tecidos de *T. cacao*, dificultam bastante o processo de extração das proteínas, em particular nas amostras de meristema e fruto. Entretanto, as amostras de sementes de cacau e de micélio de *M. pernicioso* não apresentaram dificuldades de extração justamente por não possuírem essa

mucilagem em seus tecidos. As amostras aplicadas nos géis de SDS-PAGE não foram quantitativamente padronizadas, pois, a quantidade protéica obtida por dosagem utilizando o reagente de Bradford foi muito baixa e o resultado não satisfatório. Com isso, volumes máximos do extrato protéico de cada amostra foram aplicados nos géis de acordo com a capacidade dos poços, sendo possível somente fazer uma análise qualitativa dos extratos protéicos (Figura 18). O SDS-PAGE foi uma etapa preliminar para se realizar os testes de atividade proteolítica e teve como a principal função demonstrar a qualidade da extração de proteínas totais.

Na figura 18, foi observado a presença de proteínas em todas as amostras, porém uma maior quantidade foi visualizada nas amostras de sementes (S) e do fitopatógeno (Mp), pois não possuem mucilagens em seus tecidos. Já, nas amostras de fruto (endocarpo sadio, doente e necrosado) e de meristema (sadio, vassoura verde e vassoura seca) a quantidade de proteína foi menor justamente devido à presença desses polissacarídeos em grandes quantidades.

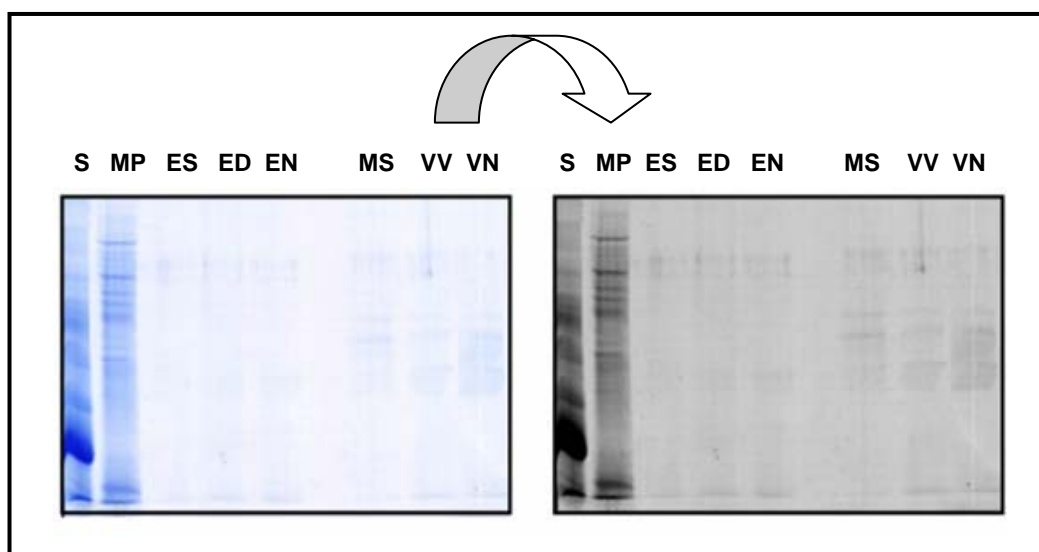


Figura 18. SDS-PAGE das amostras de *T. cacao* e de *M. perniciosa*. (A) Gel corado com o *coomassie* coloidal. (B) Mesmo gel, após a edição da imagem para melhor visualização das bandas. S = semente, MP = micélio, ES = endocarpo sadio, ED = endocarpo doente, EN = endocarpo necrosado, MS = meristema sadio, VV = vassoura verde e VS = vassoura seca.

4.4.2. Detecção da atividade proteolítica em gel de SDS-nativo

A atividade proteolítica foi determinada em eletroforese com géis de poliacrilamida nativo, utilizando no gel de separação a caseína copolimerizada como substrato. Após todo o procedimento da corrida eletroforética, a incubação em tampões de atividade e a coloração com o *coomassie* coloidal, os géis foram analisados quanto à presença ou não da degradação de proteínas. O gel que contém o substrato protéico (caseína copolimerizada) após ser corado fica totalmente azul, pois uma característica do *coomassie* é corar onde a proteína estiver presente, então, a presença de bandas claras no gel corresponde à degradação da caseína através da atividade das proteases.

As amostras de cacau foram testadas quanto à temperatura, o pH e os tampões de incubação para determinar os diferentes perfis de atividade proteolítica e escolher a melhor condição para trabalhar com as amostras vegetais. As temperaturas testadas foram 37°C e 40°C, com tampões de incubação seguintes: acetato de sódio (NaAc), NaAc com DTT (ditiotreitól) e NaAc com cisteína, todos em pH 4,0 e também com os tampões fosfato de sódio e fosfato de sódio com cisteína em pH 7,0.

As amostras de sementes (controle positivo) apresentaram atividade proteolítica em todos os tampões e pHs testados. Amostras testadas com o tampão fosfato de sódio pH 4,0 só apresentaram atividade proteolítica na temperatura de 40°C enquanto que com o tampão acetato de sódio com cisteína a atividade proteolítica só ocorreu a 37°C. Com os demais tampões ocorreram atividades variadas sendo que em algumas amostras não apresentaram atividade e em outras amostras apresentaram intensidades diferentes de atividades (Tabela 8).

Tabela 8. Comparação da atividade proteolítica em tecidos de *T. cacao* com diferentes tampões e temperaturas. (-) Não possui atividade proteolítica; (+/++) Intensidade da atividade proteolítica; (+/+++) Semente: controle positivo; (-) Ausência de atividade em tampão fosfato de sódio a 37°C; (-) Ausência de atividade em tampão NaAc/cisteína a 40°C.

Material vegetal	Tampão fosfato		Tampão fosfato/cisteína		Tampão NaAc		Tampão NaAc/DTT		Tampão NaAc/cisteína	
	(37 °C)	(40 °C)	(37 °C)	(40 °C)	(37 °C)	(40 °C)	(37 °C)	(40 °C)	(37 °C)	(40 °C)
Semente	+	++	+	++	++	+	++	+	++	++
Endocarpo sadio	-	+	+	++	++	+	++	+	+	-
Endocarpo doente	-	+	+	+	++	+	+	-	+	-
Endocarpo necrosado	-	+	++	++	++	+	+	-	+	-
Meristema sadio	-	+	-	+	++	+	+	-	+	-
Vassoura verde	-	+	-	+	++	+	+	-	+	-
Vassoura necrosada	-	+	-	+	++	+	+	-	+	-

Após esses testes foi possível selecionar a melhor temperatura, 37°C, e o melhor tampão de incubação, acetato de sódio pH 4,0 para poder analisar o perfil de atividade entre as diferentes amostras vegetais (Tabela 8).

Todas as amostras apresentaram atividade proteolítica, porém, nas amostras do endocarpo sadio, endocarpo doente, meristema sadio e vassoura verde foi mostrada a presença de três bandas de atividade, e no endocarpo em necrose e na vassoura seca foi visualizada a presença de uma quarta banda, ambas na mesma altura no gel. Embora na foto da figura 19, a amostra do endocarpo doente apareça com apenas uma banda e o endocarpo necrosado com duas, as demais bandas estavam presentes no gel, porém como estavam fracas, durante o processo de fotodocumentação não foi possível visualizá-las. É importante salientar que embora a quantidade de proteínas extraídas não tenha ocorrido numa grande concentração, mesmo assim as enzimas proteolíticas estavam presentes e exercendo seu papel na proteólise (Figura19).

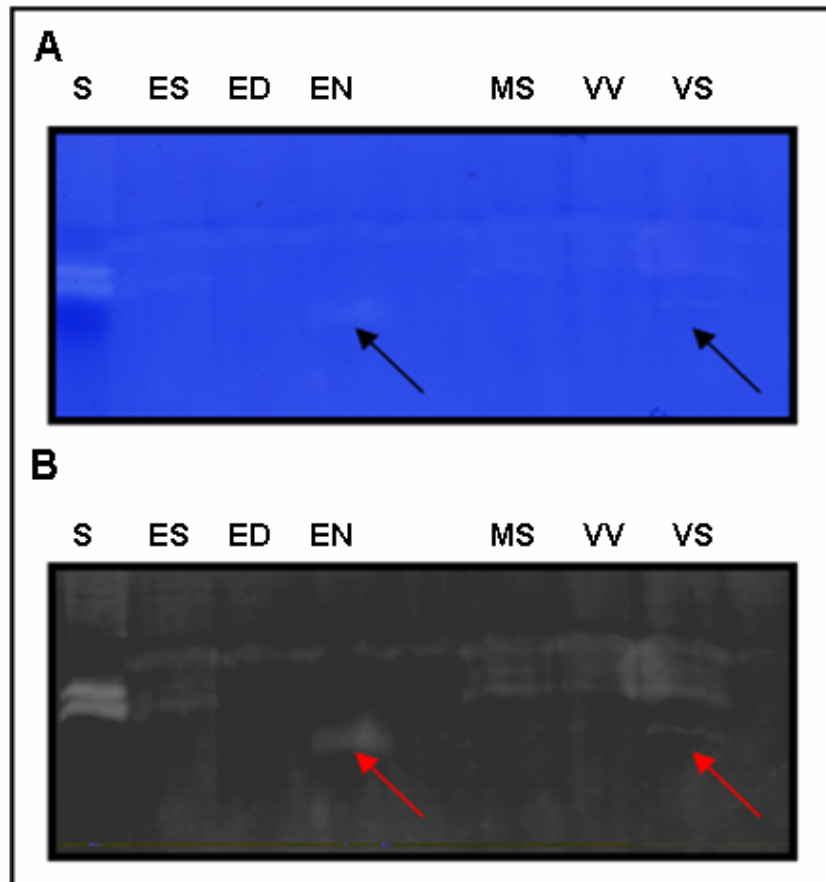


Figura 19. Presença de atividade proteolítica nas amostras de *T.cacao*. (A) Gel de atividade com a presença de bandas claras correspondendo à degradação proteolítica. (B) Mesmo gel que o anterior, após edição da imagem, demonstrando a presença mais nítida das bandas. As setas mostram a presença de uma quarta banda no fruto necrosado e na vassoura seca. S = semente, ES = endocarpo sadio, ED = endocarpo doente, EN = endocarpo necrosado, MS = meristema sadio, VV = vassoura verde e VS = vassoura seca.

Para confirmar se a quarta banda vista nas amostras do fruto necrosado e da vassoura seca era realmente do cacau e não do fitopatógeno, um novo gel foi feito utilizando o extrato protéico do micélio de *M. pernicioso*. Com esse gel (Figura 20), foi possível confirmar que as bandas antes vistas eram realmente do cacau, pois no fitopatógeno a banda localizava-se um pouco abaixo daquelas vistas no cacau. Com isso foi possível identificar que as proteases estão presentes na planta sadia e em todas as outras fases do desenvolvimento da doença, sendo que a sua atividade é mais intensa na fase necrotrófica.

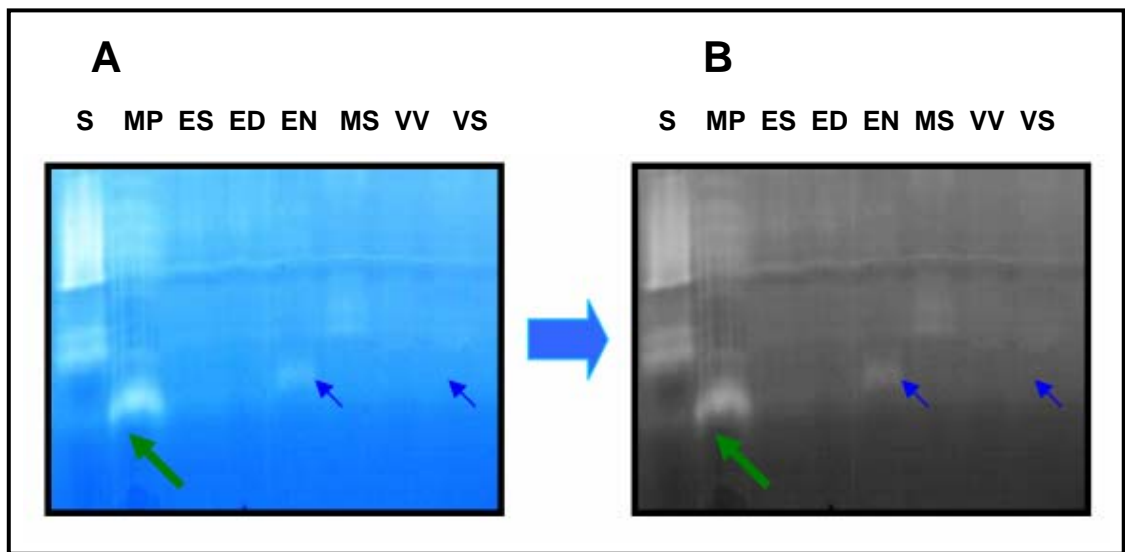


Figura 20. Comparação da atividade proteolítica do *M. perniciosus* com o fruto necrosado e vassoura seca. As figuras (A) e (B) representadas são as mesmas, antes e após edição de imagem, respectivamente. A seta verde identifica a presença da banda do fungo localizada abaixo das bandas do fruto necrosado e da vassoura seca (setas azuis). S = semente, MP = micélio, ES =endocarpo sadio, ED =endocarpo doente, EN = endocarpo necrosado, MS = meristema sadio, VV = vassoura verde e VS = vassoura seca.

5. DISCUSSÃO

5.1. *Theobroma cacao* codifica proteases que pertencem a pelo menos três distintas classes

Baseado no resíduo presente nos seus sítios catalíticos, as proteases pertencem a quatro diferentes classes: cisteínas, serinas, aspárticos e metalo proteases (VAN DER HOORN; JONES, 2004). A análise da biblioteca de cDNA da interação entre *T. cacao* e *M. pernicioso* permitiu a identificação de seqüências gênicas de proteases. Das quatro classes de proteases acima citadas, em *T. cacao* foi possível identificar seqüências gênicas pertencentes às três primeiras classes, não sendo identificada nenhuma seqüência de metalo protease.

Seqüências de cisteína, serina e aspártico proteases foram encontradas nas bibliotecas da interação resistente, e seqüências de aspárticos e cisteínas proteases foram identificadas na suscetível (Tabela 5). Entre as seqüências de cisteínas proteases de ambas as bibliotecas foram identificados genes de VPE (*Vacuolar Processing Enzymes*), que são enzimas envolvidas na morte celular programada (PCD) e na defesa de plantas contra patógenos (ROJO et al., 2004; HOEBERICHTS et al., 2003; SOLOMON et al., 1999).

O alinhamento das seqüências de proteases de *T. cacao* das diferentes classes mostrou que elas possuem similaridades com seqüências de proteases de outras espécies de plantas e com isso foi permitido também identificar a presença de regiões conservadas entre esses grupos. Das seqüências analisadas, somente o gene VPE apresentou uma díade catalítica (His-Cys), que está presente somente no

grupo das cisteínas proteases (Figura 9), não sendo, portanto identificado nenhum outro sítio catalítico entre os demais genes de proteases analisados. Cada classe de protease possui um local catalítico específico. As subtilisinas exibem uma tríade catalítica que consiste em Asp, His e Ser; as cisteínas proteases possuem uma díade catalítica formado por His e Cys e nos aspárticos proteases o local catalítico situa-se dentro do motivo Asp-Xaa-Gly, onde Xaa pode ser uma Ser ou Thr (BEERS et al., 2004). Uma possível explicação, para a não presença desses motivos conservados nas demais proteases analisadas, é que nenhum gene completo de protease foi identificado entre as seqüências analisadas e que provavelmente esses motivos conservados tenham ficado de fora da seqüência durante o re-sequenciamento desses genes.

Entre todas as seqüências de proteases de *T. cacao* alinhadas com seqüências de proteases de outros grupos vegetais, foi possível verificar que as cisteínas proteases Cys1, Cys2 e VPE tiveram um maior percentual de similaridade com as de outras espécies vegetais que as seqüências de serina e aspártico proteases também alinhadas (Tabela 7). Entre as seqüências de cisteínas analisadas, foi possível identificar similaridades entre as seqüências de VPE de *T. cacao* e VPE de *Nicotiana tabacum*. Um trabalho desenvolvido por HATSUGAI et al., em 2004, com essa espécie vegetal, mostrou o papel de uma VPE atuando como caspase, mediando à morte celular e também envolvida na supressão da proliferação do vírus TMV. A seqüência de Cys1 de *T. cacao* apresentou uma similaridade de 90% com uma cisteína protease de *Ipomoea batatas*, o que representou a maior similaridade observada entre as espécies analisadas. Uma cisteína protease denominada RD21 já foi identificada em *Ipomoea batatas*, sendo que o seu papel nesta espécie está relacionado com a sua indução durante a infecção por *Phytophthora infestans* (AVROVA et al., 1999). Já a seqüência de Cys2 de *T. cacao* apresentou similaridades com uma seqüência de cisteína protease de *Lycopersicon esculentum*. Segundo KRUGER et al. (2002), uma cisteína protease denominada RCR3 dessa espécie está envolvida na resistência da planta contra o fungo *Cladosporium fulvum*. As seqüências de proteases Ser e Asp de *T. cacao* apresentaram similaridades com seqüências de serina e aspártico proteases de *Arabidopsis thaliana*. No genoma de *Arabidopsis thaliana* foram identificadas todas as classes de proteases, sendo a classe da serina protease a maior entre os demais grupos. Entre as serinas protease, foi observada uma subtilisina agindo como um

sinalizador da resposta de defesa de plantas contra patógenos (VAN DER HOORN; JONES., 2004), e também um gene de aspártico protease causando resistência e impedindo o desenvolvimento de bactérias virulentas (XIA et al., 2004). Com base nos alinhamentos realizados entre as seqüências similares de proteases de *T. cacao* e as demais seqüências de proteases de plantas, como mostra o cladograma (Figura 13), ficou claro que as proteases se agrupam entre as suas específicas classes. Esse resultado é indicativo de que as proteases se ajustam entre os grupos que evoluíram de um antepassado comum, e por isso são agrupadas em diferentes clãs (RAWLINGS et al., 1993).

Conhecendo as funções putativas das proteases, tanto na defesa de plantas contra patógenos, como na morte celular programada, a identificação das seqüências de proteases de *T. cacao* despertou grande interesse em se investigar os possíveis papéis dessas enzimas no desenvolvimento da doença vassoura-de-bruxa, tendo em vista que já foi comprovado que na interação susceptível entre o *T. cacao*-*M. perniciosa* ocorre PCD (CEITA et al., publicação aceita em *Plant Science*), e que são grandes as chances das proteases estarem envolvidas neste papel.

5.2. Diferentes classes de proteases apresentam expressão diferencial em *Theobroma cacao* durante a infecção por *Moniliophthora perniciosa*

A expressão dos genes *CYS1*, *CYS2* e *ASP* de proteases foi observada em meristemas de *T. cacao* controle e doente pelo fungo *M. perniciosa*.

Os *primers* específicos construídos para amplificar os distintos cDNAs de proteases foram capazes de discriminar a expressão diferencial entre as duas classes de proteases analisadas através do RT-PCR semi-quantitativo (Figura 16). Uma diferença de expressão dos genes de proteases analisados ocorreu entre os diferentes tecidos vegetais. Os genes *CYS1* e *CYS2* apresentaram uma maior expressão no meristema doente. O gene *ASP*, ao contrário dos demais apresentou uma maior expressão no meristema sadio. O mesmo padrão de expressão presente entre os genes *CYS1* e *CYS2* era o esperado, tendo em vista que ambos os genes são pertencentes à classe das cisteínas proteases. Foi possível visualizar a expressão dos dois genes de cisteína proteases tanto no meristema doente como no sadio. Isso é indicativo de que estes genes são expressos em nível basal nas plantas não infectadas e que a sua expressão aumenta após a infecção da planta

pelo fitopatígeno. Em 1985, WHEELER demonstrou que o *M. perniciosa* infecta o cacauero e leva de 6 a 9 semanas dentro dos tecidos em desenvolvimento, até o aparecimento da vassoura verde e o início do processo de necrose (CEITA et al., artigo aceito em *Plant Science*). Durante a necrose tecidual e o mecanismo celular de PCD, ocorre um processo de degradação, provavelmente com o envolvimento de enzimas hidrolíticas que criam um ambiente adequado à sobrevivência do fungo (PURDY; SCHIMIDT, 1996). O processo destrutivo dos tecidos vegetais pelo fitopatígeno e a degradação protéica, onde os seus produtos serão utilizados como nutrientes, irão favorecer o crescimento do fitopatígeno (NEURATH, 1989; GRUTER, 2000). Sabendo que as proteases têm um papel na degradação protéica e também envolvimento na PCD, são grandes as chances das cisteínas proteases Cys1 e Cys2 estarem participando do processo de morte celular durante a interação do *T. cacao-M. perniciosa*. Muitas cisteínas proteases de plantas já foram identificadas participando de processos de morte celular programada, em especial as VPEs. Uma melhor evidencia a respeito da participação das cisteínas proteases na PCD seria através da análise da expressão dos genes de VPE, pois em muitas interações plantas-patógenos elas tem participado desse evento (SHIMADA et al., 2003). No entanto, no nosso estudo, não foi obtido resultados com esse gene, devido a problemas com os seus determinados *primers*.

O gene *ASP* teve mais expressão no meristema sadio do que no meristema doente. A menor expressão do gene *ASP* no meristema doente, nos dá indícios de que talvez essa protease não tenha uma participação ativa nesse evento de morte celular, bem como, muito envolvimento no desenvolvimento da doença. Comparado com outras proteases de plantas, os aspárticos proteases são menos estudados quanto ao seu envolvimento em PCD (BEERS et al., 2004). O que se sabe é que esses genes estão envolvidos em mecanismos de resistência de plantas contra o ataque de patógenos, tendo uma participação na sinalização das respostas de defesa (VAN DER HOORN; JONES, 2004). Um gene de resistência constitutiva a doença (*CDR1*), que codifica um aspártico protease apoplástico que se acumula no líquido extracelular em resposta ao ataque do *Pseudomonas syringae*, foi encontrado em *Arabidopsis thaliana*. Este gene está envolvido na sinalização da resposta de defesa da planta. A indução local do *CDR1* ativa respostas de defesa sistêmica. Uma atividade móvel do elicitor também foi detectada no líquido extracelular, com isso surgiu a hipótese de que o elicitor liberado poderia ativar

rapidamente respostas basais de defesas locais e sistêmicas, sugerindo a sua capacidade elevada de mobilidade. Moléculas como o óxido nítrico, o ácido salicílico, espécies de oxigênios reativos, alguns lipídios e seus derivados funcionam como sinais móveis curtos ou prováveis de longa distância, e mediam uma variedade de mecanismos de defesa que são subjacentes à complexidade da resposta imune própria da planta (XIA et al., 2004). A maior expressão do gene *ASP* no meristema sadio poderia estar ligada à resistência basal da planta contra patógenos. Durante a infecção, este gene poderia ser reprimido por consequência do ataque do fitopatógeno, o qual conseguiria ultrapassar as defesas basais da planta suscetível. Um fato interessante a se investigar em estudos futuros seria a função dos aspárticos proteases nas interações cacau-*M. pernicioso*, e se essa enzima teria algum envolvimento na defesa dessa planta contra esse fitopatógeno. Um estudo simples de expressão do gene *ASP* em plantas resistentes (TSH1188) infectadas e não infectadas poderia ajudar a entender o seu papel na interação cacau-*M. pernicioso*.

A análise do gene de *SER* não apresentou expressão em nenhuma das amostras de meristemas, fato este também relacionado com prováveis problemas nos *primers*, então não foi possível verificar que nível de expressão ele estaria apresentando nessa interação. Mais se sabe que as serinas proteases além das diversas funções que lhe são atribuídas em plantas, têm um papel marcante no envolvimento em muitos processos de patogênese (TORNERO et al., 1996).

Vários trabalhos sobre a interação que envolve o *T. cacao* e o *M. pernicioso* estão sendo realizados. A identificação de genes e os seus possíveis papéis nessa interação estão sendo estudados, entre eles os genes de proteases e a sua função no desenvolvimento da doença ou na resistência da planta contra esse fitopatógeno. Para trabalhos futuros, serão testados todos os genes de proteases que foram identificados nas bibliotecas de ESTs, e também a utilização de novos materiais vegetais como frutos e meristemas, resistentes e suscetíveis, em diferentes tempos e fases do desenvolvimento da doença, para dessa forma fazer uma melhor comparação entre os diferentes níveis de expressão dessas enzimas envolvidas nesse patossistema.

5.3. A atividade proteolítica é detectada em *T. cacao* em diferentes condições e fases da doença vassoura-de-bruxa

A extração protéica é um passo essencial e que precede os procedimentos de atividade proteolítica. Conseguir um bom extrato protéico é um fator determinante para se obter bons resultados na atividade das proteases. Em *T. cacao*, os frutos e meristemas possuem em seus tecidos muitos polissacarídeos, o que dificulta os procedimentos de extração de RNA (GESTEIRA et al., 2003). A mesma dificuldade foi observada para a extração de proteínas, devido a grande quantidade de mucilagem ali presente. As sementes de cacau já tinham sido testadas quanto à atividade proteolítica e foi obtido um bom resultado (comunicação pessoal, Dr. J. Cascardo). As suas proteínas são fáceis de extrair, por não possuírem esses polissacarídeos e também fáceis de serem detectadas em gel de SDS-PAGE e nativo. Sabendo dessas características das sementes, então nos ensaios, elas passaram a ser utilizadas como controle positivo. Para se conseguir um extrato com menos mucilagem, essas amostras então passaram a ser sonicadas, a fim de quebrar esses polissacarídeos e tornar a amostra mais fluida. Para tentar separar as proteínas dos polissacarídeos, também foi adaptado ao protocolo um passo da extração de RNA que é a adição de butanol terciário e acetato de sódio, que nesse caso específico é utilizado para separar os ácidos nucléicos dos polissacarídeos e precipitar estes (GESTEIRA et al., 2003). Com tudo isso feito, foi conseguido um extrato protéico melhor, porém com uma concentração baixa das proteínas totais. Manter a concentração protéica alta durante as etapas de extração é um bom ponto de partida, pois isto ajuda a manter os complexos protéicos, além de fornecer um ambiente estabilizador para a proteína de interesse e evitar a rápida perda da atividade catalítica. Soluções enzimáticas muito diluídas levam a uma perda de atividade (SCOPES, 1987). Devido às essas baixas concentrações, não foi possível realizar uma análise quantitativa dessas amostras (Figura 18), porém, diante de todos os obstáculos encontrados a fim de se conseguir uma melhor extração protéica desses materiais vegetais o resultado obtido foi muito bom, pois permitiu detectar a atividade proteolítica nos tecidos sadios e doentes pelo *M. pernicioso*.

Existem vários procedimentos para detecção de enzimas proteolíticas em gel de eletroforese. Na maioria dos casos, proteínas do extrato contendo proteases são primeiramente verificados em gel sob condições nativa ou fracamente desnaturadas,

para daí em seguida ocorrer à hidrólise da proteína ou substrato sintético em condições controladas (MICHAUD, 1998). Essa análise da atividade em gel possibilita detectar atividade de proteases na forma de extrato bruto, sem a necessidade de passar por purificações preliminares, bem como o estudo das interações proteases-inibidores (WESTERMEIER et al., 1993).

A detecção da atividade proteolítica do cacau foi observada em gel de poliacrilamida contendo o substrato caseína. Dentre as proteínas naturais mais utilizadas como substrato para esses experimentos se destacam a gelatina, a caseína e a albumina de soro bovino (BSA), segundo HEUSSEN; DOWDLE (1980). Diferentes tampões de atividade com diferentes pHs foram utilizados com o intuito de avaliar, qual deles seria o melhor para a atividade proteolítica do *T. cacao*. Esses tampões foram escolhidos a partir de algumas metodologias já testadas em outras espécies. O tampão acetato de sódio pH 4.0 e fosfato de sódio pH 7.0 foram utilizados para detectar a atividade proteolítica em *Brassica oleracea* e *Triticum aestivum* (WANG et al., 2004; DOMINGUEZ; CEJUDO, 1996). Além disso, também foram utilizados esses mesmos tampões adicionando o DTT (ditiotreitól, agente redutor) e a cisteína, conhecidos por favorecer a atividade das cisteínas proteases (BARETT, 1994). O pH e a temperatura são também importantes na detecção da atividade proteolítica, tendo em vista que as proteases são ativas em diferentes pHs. As cisteínas são ativas em pH neutro, os aspárticos em pH ácido e as serinas em pH alcalino (SIELECKI et al., 1991; BARRET, 1994; GOVIND, 1981). Testes utilizando todos os tampões e com duas diferentes temperaturas demonstram diferentes níveis de atividade e até mesmo a falta de atividade em algumas amostras. A semente (controle) como era de se esperar obteve atividade em todos os ensaios, demonstrando que as condições dos géis eram favoráveis a determinação da atividade proteolítica. Esse conjunto de testes (Tabela 8) foi realizado como uma estratégia para escolher a condição ideal de se trabalhar com a atividade proteolítica das amostras do *T. cacao*. Os tampões fosfato de sódio (37°C) e o acetato/cisteína (40°C) foram descartados, tendo em vista que nenhuma atividade foi visualizada em todas as amostras, exceto no extrato protéico de sementes. O tampão acetato/DTT (40°C) só apresentou atividade no fruto sadio e o fosfato/cisteína (37°C) não apresentou atividade nos meristemas. Embora os demais tampões tenham apresentado variados graus de intensidade na atividade, foi o tampão acetato de

sódio (37°C) o escolhido, para os seguintes experimentos, pois este proporcionou uma maior intensidade de atividade em todas as amostras vegetais analisadas.

O resultado da atividade proteolítica indicou (Figura 19) a presença de bandas claras no gel. Essas bandas representam a degradação da caseína pelas proteases. Em todas as amostras ocorreu essa degradação, representada pela presença de três bandas, porém nas amostras necrosadas (fruto necrosado e vassoura seca) foi visualizado uma quarta banda, indicativo de que a atividade proteolítica é qualitativamente diferente na fase necrotrófica da doença. A produção de proteases foi também detectada no *M. pernicioso* (BASTOS, 2005), e para determinar se as proteases encontradas nas amostras infectadas eram do fitopatógeno ou do cacau, proteínas dos micélios de *M. pernicioso* foram extraídas e aplicadas com as demais amostras. No extrato proteico de *M. pernicioso* foram observadas várias bandas de atividade de proteases, mas qualitativamente diferentes destas presentes nas amostras de cacau. Com isso foi possível comprovar que a quarta banda observada nas amostras de cacau (endocarpo necrosado e vassoura seca) era específica do cacau. (Figura 20). Potencialmente, a(s) isoforma(s) de proteases correspondentes à quarta banda pode estar envolvida no processo de PCD. Mais experimentos neste sentido deverá ser efetuado para comprovação.

Com esse trabalho, foi possível detectar a presença de proteases durante o desenvolvimento da doença vassoura-de-bruxa em frutos e meristemas e também nos sadios, porém não foi possível detectar qual protease estava envolvida nesses eventos. De acordo com os pHs dos tampões de atividade utilizado nos experimentos, há indícios de que as proteases envolvidas sejam aspárticas e cisteínas proteases, e não serinas proteases, pois estas são ativas em pH altamente alcalino (BARETT, 1994), e o pH dos tampões utilizados eram ácidos e neutros e não sendo testado nenhum tampão com o pH alcalino. Porém, somente com o uso de inibidores de proteases específicos de cada família (VAN DER HOORN; JONES, 2004) é que será possível a identificação de qual grupo de protease está presente nesse processo de interação planta-patógeno.

6. CONCLUSÃO

Cisteína, serina e aspártico proteases foram encontradas nas bibliotecas de interação *Theobroma cacao*-*Moniliophthora perniciosa*.

Os genes *CYS* (1 e 2) e *ASP* apresentam expressão diferencial entre meristemas de cacau sadios e doentes com *M. perniciosa*.

Os genes *CYS1* e *CYS2* são mais expressos nas vassouras verdes e podem estar envolvidos no processo de morte celular programada em *T. cacao*.

O gene *ASP* é mais expresso no meristema sadio e a sua expressão poderia estar reprimida pelo fungo durante a infecção.

Atividade proteolítica foi detectada em frutos e meristemas de *T. cacao* sadios e doentes.

As amostras de frutos e meristemas necrosados apresentam uma atividade proteolítica qualitativamente diferente das demais amostras, (presença de uma quarta banda). A(s) protease(s) correspondendo a essa banda pode(m) estar envolvida na morte celular programada em *T. cacao*

7. PERSPECTIVAS

Fazer uma análise da expressão gênica por PCR em tempo real com amostras de frutos e meristemas em diferentes fases da doença vassoura-de-bruxa utilizando plantas resistentes e suscetíveis à vassoura-de-bruxa e testar diferentes genes de proteases.

Para a atividade proteolítica, melhorar a concentração das proteínas extraídas para poder realizar testes quantitativos, bem como identificar as proteases envolvidas em cada fase da doença, utilizando para isso inibidores específicos para cada uma das classes de proteases.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, Z.; CLARKE, A. K. Cutting edge of chloroplast proteolysis. **Trends in Plant Science**, 7:451-456, 2002.

AIME, M. C.; MORA, W. P. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, 97(5), pp. 1012-1022, 2005.

ALMEIDA, O. C.; CHIACCHIO, F. P. B.; ROCHA, H. M. Sobrevivência de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer em vassouras secas de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) do estado da Bahia. **Agrotropica**, v. 9, p. 23–28, 1997.

ANDEBRHAN, T.; FIGUEIRA, A.; YAMADA, M. M.; CASCARDO, J.; FURTEK, D. B. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, 105: 167-175. 1999.

AVROVA, A. O.; STEWART, H. E.; DE JONG, W. D.; HEILBRONN, J.; LYON, G. D.; BIRCH, P. R. A cysteine protease gene is expressed early in resistant potato interactions with *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, 12:1114-1119, 1999.

AZEVEDO, A. M. C. de.; DE MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Characterization of an amylase produced by a *Trichoderma harzianum* isolate with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. **FEMS Microbiology Letters**, v. 188, p. 171-175, 2000.

BARETT, A. J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. **Methods in Enzymology**, 244:1–15, 1994.

BARETT, A. J. Proteolytic enzymes: aspartic and metallopeptidases. **Methods in Enzymology**, 248:183, 1995.

BASTOS, C. N. Retrospectiva e avanços no controle da vassoura-de-bruxa do cacauero. (Suplemento). **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 305-306, 2000.

BASTOS, C. N. Produção de Enzimas Extracelulares por *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, 30:286-288, 2005.

BEERS, E. P.; JONES, A. M.; DICKERMAN, A. W. The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in Arabidopsis. **Phytochemistry**, 65:43-58, 2004.

BELENGHI, B.; ACCONCIA, F.; TROVATO, M.; PERAZZOLLI, M.; BOCEDI, A.; POTICELLI, F.; ASCENZI, P.; DELLEDONNE, M. AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death. **European Journal of Biochemistry**, 270:2593-2604, 2003.

BOGUSLAWSKI, G.; SHULTZ, J. L.; YEHLE, C. O. Purification and characterization of an extracellular protease from *Flavobacterium arborescens*. **Analytical Biochemistry**, 132:41–49, 1983.

BROWNER, M. F.; SMITH, W. W.; CASTELHANO, A. L. Matrilysin inhibitor complexes: common themes among metalloproteinases. **Biochemistry**, 34:6601–6610, 1995.

BOZHKOVA, P. V.; FILONOVA, L. H.; SUAREZ, M. F.; HELMERSSON, A.; SMERTENKO, A. P.; ZHIVOTOVSKY, B.; VON ARNOLD, S.; VEIDASE is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. **Cell Death and Differentiation**, 11: 175–182, 2004.

BRENNER, S. The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. **Nature**, 334:528–530, 1988.

CEITA, G.; MACÊDO, J.; SANTOS, T.; ALEMANNI, L.; GESTEIRA, A.; MICHELI, F.; MARIANO, A.; GRAMACHO, K.; SILVA, D.; PEREIRA, G.; CASCARDO, J. “Susceptibility of *Theobroma cacao* to *Crinipellis perniciosa*: a programmed cell death triggered by calcium oxalate degradation”. Accepted in **Plant Science**.

CHARTERS, Y. M.; WILKINSON, M. J. The use of self-pollinated progenies as “in groups” for the genetic characterization of cocoa germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p.160 – 166. 2000.

CHICHKOVA, N. V.; KIM, S. H.; TITOVA, E. S.; KALKUM, M.; MOROSOV, V. S.; RUPTSOV, Y. P.; KALININA, N. O.; TALIANSKY, M. E.; VARTAPETIAN, A. B. A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. **The Plant Cell**, 16:157-171, 2004.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allies; a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. Contrib. U. S. **National Herbarium**, v. 35, p. 379-614, 1964.

DANGL, J. L.; DIETRICH, R. A.; THOMAS. Senescence and Programmed Cell Death. In: B. Buchanan, W. Gruissen, R. Jones (eds.) **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, American society of Plant Physiologists, p. 1044-1100 , 2000.

DIAS, L.A.S. (Editor). Melhoramento Genético do cacauzeiro. Viçosa, MG: **FUNAPE**, UFG, 578p, 2001.

DISTEFANO, S. ; PALMA, J. M. ; GOMEZ, M.; DEL RIO, L. A. Characterization of endoproteases from plant peroxisomes. **Biochemical Journal**, 327 : 399-405. 1997.

DOMINGUEZ, F.; CEJUDO, F. J. Characterization of the endoproteases appearing during wheat grain development. **Plant Physiology**, 112: 1211-1217, 1996.

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

FERRI, K. F.; KROEMER, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. **Nature Cell Biology**, 3: 255–263, 2001.

FRIAS, G. A.; PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Infection biology of *Crinipellis pernicioso* on vegetative flushes of cacao. **Plant Disease**, v. 7, n. 6, p. 552-556, 1991.

GESTEIRA, A.; MICHELI, F.; FERREIRA, C. F.; CASCARDO, J. C. M. Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cocoa tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis pernicioso*. **BioTechniques**, v. 35, p. 494-500, 2003.

GESTEIRA, A.; MICHELI, F.; CARELS, N.; SILVA, A. C.; GRAMACHO, K. P.; SCHUSTER, I.; MACEDO, J. N.; PEREIRA, G. A. G.; CASCARDO, J. C. M. Exploring the cacao-*Crinipellis* interaction using EST analysis. Acceptée avec révisions dans **Annals of Botany**.

GODFREY, T.; WEST, S. Industrial enzymology. **Macmillan Publishers Inc.**, New York, 2° ed, p. 3, 1996.

GOVIND, N. S.; MEHTA, B.; SHARMA, M.; MODI, V. V. Protease and carotenogenesis in *Blakeslea trispora*. **Phytochemistry**, 20:2483–2485, 1981.

GRIFFITH, G. W. et al. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. **New Zealand Journal of Botany**, v. 41, p. 423-435, 2003.

GRUTTER, M. G. Caspases: key players in programmed cell death. **Current Opinion in Structural Biology**, 10:649-655, 2000.

HARTLEY, B. S. Proteolytic enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, 29:45–72, 1960.

HATSUGAI, N.; KUROYANAGI, M.; YAMADA, K.; MESHII, T.; TSUDA, S.; KONDO, M.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. **Science**, 305: 855–858, 2004.

HEUSSEN, D.; DOWDLE, E. B. **Analytical Biochemistry**, Vol.102, p.106, 1980.

HIBBS, M. S.; HASTY, K. A.; SEYER, J. M.; KANG, A. H.; MAINARDI, C. L. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. **Journal of Biological Chemistry**, 260:2493–2500, 1985.

HOEBERICHTS, F. A.; HAVE, A.T.; WOLTERING, E. J. A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. **Planta**, 217 : 517-522. 2003.

JI, C.; BOYD, C.; SLAYMAKER, D.; OKINAKA, Y.; TAKEUCHI, Y.; MIDLAND, S. L.; SIMS, J. J.; HERMAN, E.; KEEN, N. Characterisation of a 34-kDa soybean protein for the syringolide elicitors. **Proceedings of National Academy of Science of USA**, 95:3306-3311. 1998.

KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; TAMURA, Y.; HATTORI, M.; KOHNO, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant Journal**, 37:370-378, 2003.

KRAUSS, U.; SOBERANIS, W. Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. **Biological Control**, v. 22, p. 149-158, 2001.

KRUGER, J.; THOMAS, C. M.; GOLSTEIN, C.; DIXON, M. S.; SMOKER, M.; TANG, S.; MULDER, L.; JONES, J. D. G. A tomato cysteine protease required for Cf-2-

dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. **Science**, 296:744-747, 2002.

LABBE, J. P.; REBEGROTTE, P.; TURPINE, M. Demonstrating extra-cellular leucine aminopeptidase (EC 3.4.1.1) of *Aspergillus oryzae* (IP 410): leucine aminopeptidase 2 fraction. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences** (Paris), 278D:2699, 1974.

LANAUD, C. et al. Producing and sequencing of a large collection of cocoa cDNA isolated from various organs and under various biotic and abiotic stresses. **15th International Cocoa Research Conference, San José, Costa Rica.**

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principios de Bioquímica**. Ed. Sarvier, 1995.

LINDBERG, R. A.; EIRICH, L. D.; PRICE, J. S.; WOLFINBARGER, L. JR.; DRUCKER, H. Alkaline protease from *Neurospora crassa*. **Journal of Biological Chemistry**, 256:811–814, 1981.

LOPEZ-OTIN, C.; OVERALL, C.M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, 3: 509–519, 2002.

MADEO, F.; HERKER, E.; MALDENER, C.; WISSING, S.; LA" CHELT, S.; HERLAN, M.; FEHR, M.; LAUBER, K.; SIGRIST, S. J.; WESSELBORG, S.; FRO" HLICH, K. U. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. **Molecular Cell**, 9:911-917, 2002.

MENON, A. S.; GOLDBERG, A. L. Protein substrates activate the ATP-dependent protease La by promoting nucleotide binding and release of bound ADP. **J. Biological Chemistry**, 262:14929–14934, 1987.

MICHAUD, D. Gel electrophoresis of proteolytic enzymes. **Analytica Chimica Acta**, v.372, p. 173-185, 1998.

MICHELI, F.; SUNDBERG, B.; GOLDBERG R.; RICHARD L. Radial distribution pattern of pectin methylesterases across the cambial region of hybrid aspen at activity and dormancy. **Plant Physiology**, 124: 191-199. 2000.

MOTILAL, L. A.; SIRJU-CHARRAN, G.; SREENIVASAN, T. N. Effect of *Crinipellis pernicioso* infection on abscission of cacao cotyledons, reserve mobilization and dry matter partitioning. **Journal of Phytopathology**, v. 151, p. 546-552, 2003.

NEURATH H.; BEYNON, R. J.; BOND, J. S. The diversity of proteolytic enzymes. **Proteolytic Enzymes a Practical Approach**, Oxford, UK: IRL Prees, 1-13,1989.

ORCHARD, J.; COLLIN, H. A.; HARDWICK, K.; ISAAC, S. Changes in morphology and measurement of cytokin levels during the development of witches' brooms on cocoa. **Plant Pathology**, v.43, p.65-72, 1994.

PAUTOT, V.; HOLZET, F. M.; REISCH, B.; WALLING, L. L. Leucine aminopeptidase: an inducible component of the defence response in *Lycopersicon esculentum* (tomato). **Proceedings of National Academy of Sciences of USA**, 90:9906-9910, 1993.

PECHAN, T.; YE, L.; CHANG, Y.; MITRA, A.; LIN, L.; DAVIS, F. D.; WILLIAMS, W. P.; LUTHE, D. S. A unique 33-kD cysteine proteinase accumulates in response to larval feeding in maize genotypes resistant to fall armyworm and other Lepidoptera. **The Plant Cell** 12:1031-1040, 2000.

PHADATARE, S. U.; DESHPANDANDE V. V.; SRINIVASAN M. C. High activit alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents. **Enzyme and Microbial Technology**, 15: 72 - 76, 1993.

PINTO, L. R. M.; PIRES, J. L. Seleção de plantas de cacau resistente à vassoura-de-bruxa. **Boletim Técnico** n° 181. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC, 34 p.1998.

PURDY, L. H.; SCHIMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: Biology, epidemiology and management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 537 – 94, 1996.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 597-635, 1998.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **The Biochemical Journal** 290:205–218, 1993.

ROJO, E.; MARTIN, R.; CARTER, C.; ZOUHAR, J.; PAN, S.; PLOTNIKOVA, J.; JIN, H.; PANEQUE, M.; SANCHEZ-SERRANO, J. J.; BAKER, B, et al. VPEgamma exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. **Current Biology**, 14: 1897–1906, 2004.

SAID, S.; PIETRO, R. Enzimas de interesse industrial e biotecnológico. Ed. Eventos p121, 2002.

SCOPES, R. K. Protein Purification-Principles and Practice. **Springer-Verlag**. 1987.

SHANNON, J. D.; BARAMOVA, E. N.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Amino acid sequence of a *Crotalus atrox* venom metalloprotease which cleaves type IV collagen and gelatin. **Journal of Biological Chemistry**, 264:11575–11583, 1989.

SHIMADA, T.; TAMADA, K.; KATAOKA, M.; NAKAUNE, S.; KOUMOTO, Y.; KUROYANAGI, M.; TABATA, S.; SHINOZAKI, K.; SEKI, M.; KOBAYASHI, M. et al. Vacuolar processing enzymes are essential for proper processing of seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, 278:32292-32299, 2003.

SIELECKI, A. R.; FUJINAGA, M.; READ, R. J.; JAMES, M. N. G. Refined structure of porcine pepsinogen at 1.8Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, 219:671,1991.

SILVA, S. D. V. M. et al. Redescritção da sintomatologia causada por *Crinipellis pernicios*a em cacauzeiros. **Agrotropica**, v. 14, n. 1, p. 1 – 28. 2002.

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEM, E.; LEVINE, A. The involvement of cysteine proteases and proteinase inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **The Plant Cell**, 11: 431-443. 1999.

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

SOUZA, C. A. S.; DIAS, L. A. S. Melhoramento ambiental e sócio-economia. In: DIAS, L.A.S. **Melhoramento genético do cacauzeiro**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa Ltda, p. 1– 47, 2001.

SUAREZ, M. F.; FILONOVA, L. H.; SMERTENKO, A.; SAVENKOV, E.I.; CLAPHAM, D. H.; VON ARNOLD, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; BOZHKO, P. V. Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. **Current Biology**, 14: 339–340, 2004.

TORNERO, P.; MAYDA, E.; GOMEZ, M. D.; CANAS, L.; CONEJERO, V.; VERA, P. Characterisation of LRP, a leucine-rich repeat (LRR) protein from tomato plants that is processed during pathogenesis. **The Plant Journal**, 10:315-330, 1996.

TREVIZAN, S. D. P. Mudanças no sul da Bahia associada a vassoura-de-bruxa do cacao. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12, Salvador. 1996. Proceedings, Lagos : **Cocoa Producers Alliance**, p. 1109-1116, 1996.

UREN, A. G.; O'ROURKE, K.; ARAVIND, L.; PESABARRO, M. T.; SESHAGIRI, S.; KOONIN, E. V.; DIXIT, V. M. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. **Molecular Cell**, 6:961-967, 2000.

VAN DER HOORN, R. A. L.; JONES, J. D. G. The plant proteolytic machinery and its role in defence. **Current Opinion in Plant Biology**, 7:400-407. 2004.

VAN DER HOORN, R. A. L. ; LEEUWENBURGH, M. A. ; BOGYO, M. ; JOOSTEN, M. H. A. J.; PECK, S. C. Activity Profiling of Papain-Like Cysteine Proteases in Plants. **Plant Physiology**, 135 : 1170-1178. 2004.

VELLO, F.; GARCIA, J. R. Características das principais variedades de cacau cultivadas na Bahia. **Revista Theobroma**, Ilhéus, v. 1(2), p. 3 – 10, 1971.

WANG, Y. T.; YANG, C. Y.; CHEN, Y. T.; LIN, YEN.; SHAW, J. F. Characterization of senescence-associated proteases in postharvest broccoli florets. **Plant Physiology and Biochemistry**, 663-670, 2004.

WATANABE, N.; LAM, E. Recent advance in the study of caspase like protease and Bax inhibitor-1 in plants: their possible roles as regulators of programmed cell death. **Molecular Plant Pathology**, 5:65-70, 2004.

WATSON, R. R. Substrate specificities of aminopeptidases: a specific method for microbial differentiation. **Methods in Microbiology**, 9:1–14, 1976.

WESTERMEIER, R.; BARNES, N.; GRONAU, C. B. S. et al. Eletrophoresis in practice. **A guide to theory and practice**, P.227, 1993.

WHEELER, B. E. J. The growth of *Crinipellis pernicioso* in living and dead cocoa tissue. In: Moore D, Casselton LA, Wood DA, Frankland JC, eds. **Developmental Biology of Higher Fungi**, Cambridge University Press, p. 103-116, 1985.

WHITAKER, J. R. Principles of Enzymology for the Food Sciences; 2° ed, New York: Marcel Dekker, Cap.: **Introduction to the hydrolases**, p. 387-389, 1994.

WOLTERING, E. J.; VAN DER BENT, A.; HOEBERICHTS, F. A. Do plant caspases exist? **Plant Physiology**, 130: 1764–1769, 2002.

XIA, Y.; SUZUKI, H.; BOREVITZ, J.; BLOUNT, J.; GUO, Z.; PATEL, K.; DIXON, R. A.; LAMB, C. An extracellular aspartic protease functions in Arabidopsis disease resistance signalling. **EMBO Journal**, 23:980-988, 2004.

ZAIDAN, H. A.; GESTEIRA, A. S.; MICHELI, F. F. L.; CEITA, G. O.; CASCARDO, J. C. M.; CARELS, N.; BRAZ, N. G. R.; SERRA, W. O.; GRAMACHO, K. P.; LOPES, U. V.; Caracterização molecular da resistência do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) a vassoura de bruxa. In: XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2005, Brasília. **Anais do XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 2005.