

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



**ALTERAÇÕES PROTEÔMICAS INDUZIDAS PELO FUNGO *Moniliophthora perniciosa* EM GENÓTIPOS DE CACAUEIRO CONTRASTANTES PARA RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA.**

**EVERTON CRUZ DOS SANTOS**

**ILHÉUS– BAHIA – BRASIL**  
**Junho de 2014**

**EVERTON CRUZ DOS SANTOS**

**ALTERAÇÕES PROTEÔMICAS INDUZIDAS PELO FUNGO *Moniliophthora perniciosa* EM GENÓTIPOS DE CACAUEIRO CONTRASTANTES PARA RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA**

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

**Área de concentração:**  
Bioquímica e Proteômica

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**  
**Junho de 2014**

S237 Santos, Everton Cruz dos.  
Alterações proteômicas induzidas pelo fungo  
Moniliophthora perniciosa em genótipos de cacauero  
contrastantes para resistência à vassoura-de-bruxa /  
Everton Cruz dos Santos. – Ilhéus, BA: UESC, 2014.  
118 f. : il. ; anexos.

Orientadora: Karina Peres Gramacho.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual  
de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Biologia Molecular.  
Referências bibliográficas: f. 92-110.

1. Cacau – Doenças e pragas. 2. Vassoura-de-Bru-  
xa (Fitopatologia). 3. Espectrometria de massa. 4.  
Proteômica. I. Título.

CDD 633.74

**EVERTON CRUZ DOS SANTOS**

**ALTERAÇÕES PROTEÔMICAS INDUZIDAS PELO FUNGO *Moniliophthora perniciosa* EM GENÓTIPOS DE CACAUEIRO CONTRASTANTES PARA RESISTÊNCIA À VASSOURA-DE-BRUXA.**

APROVADA: 6 de junho de 2014

Dr. Sérgio Herminio Brommonschenkel  
(UFV-Viçosa)

Dr. Marcio G. C. Costa  
(UESC-Ilhéus)

Dr<sup>a</sup>. Abelmon da Silva Gesteira  
(UESC-Ilhéus)

Dr<sup>a</sup>. Karina Peres Gramacho  
(CEPLAC/UESC-Orientadora)

**Aos meus pais, Precídio e Eliene.  
Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por tornar possível esse projeto e por todas as graças concedidas.

Aos meus pais, Eliene e Cid, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade. Vocês são minha inspiração.

Aos meus irmãos Alex, Daiane, Priscila e Eline pelo companheirismo, resenhas, lágrimas de toda uma vida!.

À minha namorada Range por me aguentar durante todo esse tempo sem desistir, você é uma santa (rs) !

À Dr.<sup>a</sup> Karina Peres Gramacho, Dr.<sup>a</sup> Fabienne Florence Lucienne Micheli e ao Dr. Carlos Priminho Pirovani, pela orientação, pelas contribuições, pelas perguntas sobre patossistemas e proteômica (rsrsrs) indispensável para a conclusão deste trabalho. Obrigado pela oportunidade.

À Joelma Tarcy e Everton P. Dispensando comentários (rsrsrsrsr). Love ya.

À família Fitomol, em especial Sanlai, Louise, Nara, Francisca, Kaleandra Mariana, Tami, Analine e Geovane Campanha, sem vocês eu teria menos motivos pra sorrir durante esses 2 anos, e claro sentiria mais fome (altas comilanças)!!!

À família CBG em especial, Milena Dória, Regina, Ana Camila, Leila Carvalho Jamilly, Angela, Luana e seu marido Tainã, Marcinha, Daniel, Lu camillo, Lais e Edson, Sara! (Seus loucos!).

Aos MALACAS (EU AMO VOCÊS). Paty por compartilhar o milésimo pedaço de frango comigo rsrsrs, Letícia, Sah ,Elilll, Gabola, Thalles, Aline, Nara, Dis, Lorena, Milena Amaral, Mary, Léo, Guido (irmão preto ! ) saudades super hiper mega power de vocês! Minha segunda família.

À CEPLAC/CEPEC/FITOMOL, pela infraestrutura laboratorial para realização de todos os trabalhos.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, por tornarem esse desafio viável.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo financiamento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

OBRIGADO.

“Não é nossa função controlar todas as marés do mundo, mas sim fazer o que pudermos para socorrer os tempos em que estamos inseridos, erradicando o mal dos campos que conhecemos, para que aqueles que viverem depois tenham terra limpa para cultivar. Que tempo encontrarão não é nossa função determinar”

- Gandalf

## ÍNDICE

<b>EXTRATO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>03</b>
2.1. Proteínas e expressão gênica.....	03
2.2. Interação planta-patógeno.....	05
2.3. Histórico e aspectos econômicos da vassoura-de-bruxa do cacau.....	07
2.4. Ciclo de vida do <i>M. perniciosa</i> .....	08
2.5. Resistência à vassoura-de-bruxa.....	09
2.6. Proteômica em cacau.....	12
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
3.1. Material vegetal.....	14
3.2. Obtenção de inóculo.....	14
3.3. Inoculação.....	15
3.4. Delineamento experimental.....	16
3.5. Extração protéica.....	17
3.6. Dosagem de Proteínas.....	18
3.7. Eletroforese 1D.....	19
3.8. Focalização isoeletrica (primeira dimensão).....	19
3.8.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (segunda dimensão).....	20
3.8.1.1. Preparação das <i>strips</i> .....	20
3.8.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (segunda dimensão).....	21
3.9. Obtenção de imagens e análise estatística.....	21
3.10. Extração de peptídeos em gel e espectrometria de massas.....	22
3.10.1 Excisão e digestão trípica.....	22
3.10.2 Espectrometria de massas (LC/MS/MS).....	23
3.11. Anotação funcional das proteínas.....	24



<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
4.1. Germinação e sintomas.....	25
4.1.2.Obtenção de ápices caulinares apicais e extração protéica.....	25
4.2.Perfil proteico de ápices caulinares não inoculados e inoculados com <i>Moniliophthora perniciosa</i> .....	27
4.3. Identificações de <i>spots</i> proteicos diferencialmente expressos.....	36
4.4. Classificação funcional e localização subcelular das proteínas identificadas.....	40
4.5. Proteínas identificadas.....	43
4.5.1. Estresse oxidativo.....	43
4.5.2. Metabolismo de carboidratos e fotossíntese.....	44
4.5.3. Defesa e estresse.....	46
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
5.1.Análise de perfil proteico de <i>spots</i> detectados.....	76
5.2. Proteínas de estresse Oxidativo.....	78
5.3. Metabolismo de carboidratos e fotossíntese.....	80
5.4. Defesa e estresse.....	82
5.5. Outras proteínas.....	87
5.6. Proteínas fúngicas.....	88
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>90</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>109</b>

## EXTRATO

SANTOS, Everton Cruz, MS; Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Junho 2014. **Alterações proteômicas induzidas pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* em genótipos de cacauero contrastantes para resistência à vassoura-de-bruxa.** Advisor: PhD. Karina PeresGramacho. Advisor Committe Members: DSc Carlos Priminho Pirovani and DSc Fabienne Micheli.

*Moniliophthora perniciosa* é o agente causal da vassoura-de-bruxa do cacauero, a doença mais importante que acomete as plantações de cacau na Bahia. O principal desafio é desenvolver cultivares com resistência durável. Para atingir esse objetivo, ferramentas de biologia avançada como genômica, proteômica e metabolômica - as ômicas – estão sendo aplicadas de forma integrada ao melhoramento clássico a fim de auxiliar o desenvolvimento de variedades com resistência durável. Este trabalho teve como objetivo comparar os perfis proteicos de diferentes genótipos de cacau, suscetível e resistente, em resposta a infecção pelo fungo *M. perniciosa*, durante a fase biotrófica da infecção. Meristemas de plantas inoculadas e não inoculadas foram coletados e submetidos à extração proteica pelo método fenol/SDS-Denso associado à sonicação. As proteínas obtidas foram quantificadas e analisadas em Géis SDS-PAGE para verificar a qualidade dos extratos proteicos. Posteriormente foram focalizadas e submetidas à segunda dimensão através de corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 12,5%. Após análise das imagens, os *spots* diferencialmente expressos foram selecionados e identificados por LC/MS/MS com UPLC nanoAcquity, acoplado ao espectrômetro de massas Micromass Q-TOFmicro. Quinhentos e oitenta e dois *spots* protéicos foram identificados, 254 para o genótipo suscetível e 328 para o genótipo resistente e as funções das proteínas foram acessadas através da ferramenta Blast2Go. As proteínas identificadas durante a interação estão envolvidas principalmente no metabolismo, energia, defesa e estresse oxidativo. O genótipo resistente apresentou maior número de proteínas expressas, bem como uma variedade maior de proteínas associadas à defesa e estresse, enquanto o genótipo suscetível apresentou mais proteínas sendo reprimidas durante a interação. Dentre essas proteínas destacam-se proteínas relacionadas à patogênese (PRs), proteínas relacionadas à regulação de estresse oxidativo, bem como proteínas de choque térmico (HSPs) que foram expressas diferencialmente entre os genótipos durante os tempos analisados. Esses resultados indicam que as respostas no genótipo resistente são mais intensas e efetivas.

**Palavras-chave:** Espectrometria de massas, *Moniliophthora perniciosa*, proteômica, *Theobroma cacao*.

## ABSTRACT

SANTOS, Everton Cruz,MS; UniversidadeEstadualdeSantaCruz,Ilhéus, Junho 2014. **Alterações proteômicas induzidas pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* em genótipos de cacauero contrastantes para resistência à vassoura-de-bruxa.**Advisor: PhD. Karina PeresGramacho. Advisor Committe Members: DSc Carlos Priminho Pirovani and DSc Fabienne Micheli.

*Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao, is one of the most important disease that affect cacao plantations. The main challenge of this phytopathological problem is to develop cultivars with durable resistance. To achieve this aim, advanced biology approaches, like genomics, proteomics, and metabolomics-“the omics”- have been used in an integrated way to improve classical plant breeding, to aid the development resistant varieties. This work aims to compare proteomics profiles between different cocoa (*Theobroma cacao*, L) genotypes, susceptible and resistant, in response to infection by *M. perniciosa* during the biotrophic phase of infection. Meristems of inoculated and non-inoculated plants of each genotype were then subjected to protein extraction through the Phenol/Dense SDS protocol associated with sonication. The obtained proteins were quantified and then subject to 2D-PAGE to analyze the proteic extract viability, after they were focused and subjected to second dimension by electrophoresis run in 12 % polyacrylamide gels. Scanned images of proteic spots were analyzed and the spots differently expressed were selected and identified by LC/MS/MS with UPLC nanoAcquity attached to mass spectrometer Micromass Q-TOFmicro. Five hundred eighty-two were identified, 254 in the susceptible and 328 in the resistant genotype and protein functions were accessed by Blast2Go. The identified proteins during the interaction were involved mainly in metabolism, energy, defense and oxidative stress. The resistant genotype showed more expressed proteins as well as more variability of proteins associated to stress and defense, while the susceptible genotype showed more repressed proteins. Among these proteins, stand out pathogenesis related proteins (PRs), protein related with oxidative stress regulation, as well as, heat shock proteins (HSP) that were differentially expressed between the genotypes during the analyzed times. These results indicate that responses in resistant genotype are more intense and effective.

**Keywords:** Mass spectrometry, *Moniliophthora perniciosa*, proteomics, *Theobroma cacao*.

## 1. INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao* L.) pertencente à família Malvaceae, é uma espécie perene nativa da América do Sul que tem origem nas nascentes dos Rios Amazonas e Orinoco, de ocorrência em regiões de climas tropicais em países como Colômbia, México, Peru e nas Ilhas Caribenhas, bem como em países Africanos (GRAMACHO *et al.*, 1992; PEREIRA *et al.*, 1989; SOUNIGO *et al.*, 2003).

A vassoura-de-bruxa do cacau (VBC) é causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (AIME e PHILLIPS-MORA, 2005), pertencente à classe Basidiomycetes, ordem Agaricales e família Tricholomataceae. A VBC é a principal doença relacionada à cacauicultura no Brasil, desde o fim da década de 80 tem causado grandes perdas à economia baiana (PERES FILHO, 1998). Apesar de a economia cacaueira ter apresentando alguma recuperação a partir do fim da década de 1990 com o desenvolvimento de clones que apresentam resistência, ainda assim essa doença continua sendo um problema para a cacauicultura brasileira (PIRES *et al.*, 1996; 1999).

*M. perniciosa* é um fungo hemibiotrófico, apresentando duas fases morfológicas e fisiológicas distintas em seu ciclo de vida, sendo uma parasítica e monocariótica, com crescimento micelial intercelular em tecidos hipertrofiados (vassoura verde). E outra saprofítica e dicariótica, com crescimento intracelular com grampos de conexão, sendo encontrada em tecidos necrosados (vassoura seca) e meios de culturas artificiais. Os dois tipos morfológicos podem ser encontrados na vassoura verde embora haja prevalência do micélio monocariótico (EVANS e BASTOS, 1980; ANDEBRHAN *et al.*, 1999; CEITA *et al.*, 2007, MEINHARDT *et al.*, 2006).

Os danos causados às lavouras de cacau pela doença vassoura-de-bruxa motivaram estudos genômicos nos últimos anos. O projeto genoma do fungo (MONDEGO *et al.*, 2008) e do cacau (ARGOUT *et al.* 2011) foram executados, fornecendo informações para análises pós-genômicas da interação. As pesquisas têm sido direcionadas, principalmente, para análise de expressão gênica em tecidos de genótipos de cacau, bem como o sequenciamento de cDNA de diferentes fases do ciclo de vida do fungo (PIRES *et al.*, 2009). Do mesmo modo, a confecção de bibliotecas de cDNA da interação cacau-*M. perniciosa* (GESTEIRA *et al.* 2007), expressão gênica e metabolismo em micélio biotrófico e saprofítico (RINCONES *et al.*, 2008). Porém sabe-se que esses estudos por si só não são suficientes para compreender totalmente a natureza deste tipo de interação (PANDEY e MANN, 2000), principalmente pela diferença entre níveis de estudos genômicos e proteômicos.

A proteômica tem a vantagem de estudar o produto final da expressão gênica ajudando a compreender o que de fato está sendo traduzido bem como seu perfil de acumulação, pois sabe-se que essas características são importantes na compreensão de modificações metabólicas.

O nível de proteínas expressas ou acumuladas podem sofrer interferências pós-transcricionais e traducionais, por isso nem sempre corresponde ao nível de expressão de seus genes ou mRNA's (GYGI *et al.*, 1999). Os genes através de mecanismos pós transcricionais podem gerar múltiplas proteínas, sendo o número de proteínas preditas por um dado genoma muito maior do que a quantidade de genes codificantes em eucariotos.

Assim é comum encontrar, durante a análise de proteomas, proteínas ainda não indentificadas ou com funções ainda não descritas e com ontologia genética incompletas, estes resultados podem levar a descoberta de proteínas importantes. Portanto, a aplicação das técnicas proteômicas são necessárias e somam-se a estes conhecimentos completando de forma eficaz a compreensão destas relações, pois possibilita a identificação de proteínas que estão sendo expressas, seus níveis de expressão, momento da expressão e em alguns casos as modificações pós-traducionais (OH *et al.*, 2009).

Pouca atenção tem sido dada as análises proteômicas durante a interação *T. cacao* x *M. pernicioso*. Assim, o objetivo deste trabalho foi fazer uma análise comparativa e quantitativa da acumulação proteica total durante diferentes estágios da doença em genótipos contrastantes para a resistência à vassoura-de-bruxa. Para tanto foi utilizado estratégias de extração protéica apropriada para tecidos do cacau (etapa decisiva para a obtenção de perfis proteicos satisfatórios) e 2D PAGE seguido de espectrometria de massas, aumentando o conhecimento das bases moleculares da interação entre *M. pernicioso* e seu hospedeiro cacau para a elucidação de muitas questões ainda em aberto.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Proteômica, proteínas e expressão gênica

A proteômica é o estudo de proteínas em larga escala, que tem por finalidade analisar funções, estrutura, modificações, localização e interações proteicas por meio de técnicas bioquímicas e computacionais. É uma técnica bastante eficiente no estudo da expressão gênica, pois consegue abranger eventos que interferem no produto final da expressão, como as modificações pós-traducionais que não podem ser analisados a nível de estudos baseados em RNA. O termo “proteoma” foi inicialmente proposto em 1994 por Marc R. Wilkins, um cientista australiano, para se referir a todo conjunto de proteínas expressas por um indivíduo, célula ou tecido em um tempo determinado e condições específicas (WASINGER, 1995). A proteômica é caracterizada, como o conjunto de técnicas aplicadas ao estudo de proteomas. Embora o termo proteoma seja relativamente novo, as raízes desse conceito datam da década de 70 com o desenvolvimento da eletroforese bidimensional de proteínas (2D-PAGE) (O’FARRELL, 1975) que possibilitou a análise de misturas complexas de proteínas sendo possível analisar, teoricamente, de 1000 a 5000 produtos gênicos em um único gel.

Havia um consenso que transcritos abundantes apresentavam níveis de proteínas correspondentes também abundantes, no entanto, diversos trabalhos mostraram resultados que nem sempre seguem esta regra. As baixas correlações podem ser explicadas principalmente pelas modificações pós-traducionais que as proteínas podem sofrer e que influenciam diretamente a estrutura, localização, metabolismo, regulam funções, atividades e alteram a estabilidade das mesmas. Essas modificações podem influenciar diretamente a abundância de proteínas, sugerindo que o acúmulo de proteínas é parcialmente determinada pelo acúmulo e degradação de mRNAs (LICHTINGHAGEN *et al*, 2002; JAWON SEO; KONG-JOO LEE, 2004).

As proteínas podem variar quanto a sua meia vida *in vivo* e ainda, os erros nos experimentos tanto com RNA quanto com proteínas, limitam a aquisição de uma imagem mais próxima do que realmente ocorre a nível metabólico (GREENBAUM *et al*, 2003), pois não existe um método que consiga analisar com 100% de cobertura todos os RNAs ou proteínas sendo expressos em um determinado momento. GYGI *et al*. (1999) mostrou que níveis similares de expressão de mRNA podem ser acompanhados por uma variação grande (acima de 20 vezes) de abundância de proteínas e vice e versa.

Anderson e Seilhamer (1997) encontraram um coeficiente de correlação de 0,48 entre transcritos e o acúmulo de suas proteínas correspondentes a partir de células do fígado envolvidas na secreção de proteínas plasmáticas. LAN *et al.* (2012) mostrou que *Arabidopsis* em situação de deficiência de fosfato, a regulação transcricional era apenas parcialmente acoplada a regulação protéica devido a extensiva regulação transcricional e pos-transcricional.

Por apresentarem papéis importantes na maioria dos processos biológicos, as proteínas têm seus padrões de expressão altamente regulados e conservados (LAURENT *et al.*, 2010). Neste mesmo trabalho, os autores verificaram que a abundância de proteínas apresentou correlação significativa em diferentes táxons abrangendo organismos de diferentes espécies como bactérias, nematóides, humanos, arroz e levedura, quando comparados a mRNAs correspondentes, sugerindo que ocorre uma pressão seletiva durante a evolução para manter a abundância dessas proteínas estável mesmo quando a quantidade de mRNA diverge.

Os dados apresentados reforçam o potencial que as análises proteômicas possuem para fornecer respostas mais completas para diversos processos bioquímicos, sendo de importância ímpar na compreensão global desses mecanismos, pois possibilita a identificação de proteínas expressas e seus níveis de expressão, bem como o momento da expressão e as modificações pós-traducionais que ocorrem nas diversas situações nas quais os organismos são submetidos (TAEK OH, *et al* 2009).

Dentre as técnicas de proteômica de alto rendimento utilizada em plantas, A proteômica de gel 2DE ou Eletroforese bidimensional (*2-DE-bi-Dimensional-Electrophoresis*), é muito utilizada para a análise de comparação entre perfis protéicos principalmente dado a seu baixo custo. A técnica resume-se na separação de proteínas em duas etapas eletroforéticas a partir de um extrato proteico, baseando-se em um modelo criado por O'FARREL (1975). Sendo a primeira etapa de separação uma focalização isoeétrica, onde as proteínas são separadas por seus pontos isoeletricos (migram até atingir carga líquida zero, ou seja, seu ponto isoeletrico) quando submetidas a um campo elétrico de alta voltagem. A segunda etapa é outra corrida eletroforética em um gel de poliacrilamida, onde as proteínas serão separadas de acordo com a sua massa molecular. Ao fim das duas etapas os géis 2-DE possuem informação acerca do ponto isoeletrico (1ª dimensão) e massa molecular (2ª dimensão). Contudo esta técnica apresenta algumas limitações, como reprodutibilidade, limitação por pH das proteínas, difícil detecção de proteínas pouco abundantes e proteínas altamente hidrofóbicas.

## 2.2. Interação planta-patógeno

As plantas, diferentes dos animais, são sésseis e não podem fugir quando são atacadas, além disso, não apresentam anticorpos contra possíveis patógenos que possam prejudicá-la. Para superar esse impasse, as plantas, ao longo da evolução desenvolveram mecanismos físicos, bioquímicos, e genéticos para sobrepujar a ação dos invasores (WIT, 2007).

Na natureza, a regra quanto às interações planta-patógeno é a resistência e a suscetibilidade a exceção. Uma vez que um número limitado de patógenos é capaz de infectar determinada espécie ou cultivar. O sistema de defesa vegetal é complexo e capaz de evitar ou atrasar a entrada de fitopatógenos em seus tecidos (AGRIOS, 1997; VALE, *et al* 2001; PASCHOLATTI, 1995; AGRIOS, 1997; BARI; JONES, 2009). A alta capacidade de adaptação permite que sobrevivam, mesmo seu desenvolvimento sendo prejudicado (MARGIS-PINHEIRO *et al.*, 1999; BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005), de outra forma as populações naturais de vegetais não se manteriam e seriam eliminadas durante o processo evolutivo.

Os mecanismos de defesa são formados por elementos pré-formados e pós-formados (TAIZ; ZEIGER, 2004). Os mecanismos pré-formados, ou elementos de defesa de primeira linha, são os elementos constitutivos que podem ser físicos, como as caloses, papilas, lignificação da parede celular, camadas de cortiça, camada de abscisão ou bioquímicos, como os taninos fenóis, alcalóides, fototoxinas, glicosídeos cianogênicos e glicosídeos fenólicos. (ASCHOLATI e LEITE, 1994). Enquanto que os elementos pós-formados são apenas ativados quando as plantas são expostas a algum estresse, conhecidos por agentes indutores, que podem ser de natureza biótica ou abiótica. Estes elementos podem englobar o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas-PR (Proteínas- *Pathogenesis related*), bem como a formação de radicais livres, oriundos principalmente do estresse oxidativo (PASCHOLATI, 1994; VAN LOON *et al.* 2006).

As interações entre plantas e fitopatógeno podem ser caracterizadas em compatíveis onde o hospedeiro é suscetível, que implica na doença propriamente dita, e durante a interação *M. perniciosa* x cacau é fenotipicamente expressada pela formação de vassouras verdes que evoluem a vassoura seca (CORDEIRO; SÁ, 1999). E incompatíveis onde o hospedeiro é resistente, em que estruturas presentes nos vegetais são capazes de detectar a presença de uma ameaça em potencial a partir de sinais químicos provenientes do patógeno, acarretando em respostas bioquímicas rápidas e mudanças fisiológicas, que tornam o



ambiente desfavorável para o crescimento e multiplicação do invasor (NIMCHUK *et al.*,2003)

É importante ressaltar que na interação em que a planta é resistente pode haver a completa ausência da doença, o que caracteriza uma planta “imune” ou o aparecimento de sintomas tênues, estes não prejudicam a planta ou a sua produção (MATHEWS, 2002). Já na interação compatível, a planta é mais vulnerável ao ataque do fitopatógeno, mesmo assim são ativados mecanismos de defesa. A diferença para uma planta resistente está associada ao o tempo, variedade e intensidade das respostas que constituem um fator crucial na penetração e colonização do patógeno (RESENDE *et al*, 2003)

Na interação incompatível ocorre a morte celular no sítio de penetração do patógeno, pois as células dos hospedeiros são capazes de reconhecer elicitores do patógeno e iniciar tal processo evitando assim a proliferação do mesmo. Este mecanismo faz parte da reação de hipersensibilidade, do inglês *Hipersensitive response* (HR), e está associado a outros efeitos, tais como, síntese de fitoalexinas e proteínas relacionadas à defesa as proteínas-PR's (HAMMOND-KOSACK, 1996; MARGIS-PINHEIRO *et al.*,1999; WOHLGEMUTH, 2002; NIMCHUK, 2003).

As PR's também são ativadas durante um evento de invasão por um fitopatógeno, ou estresse de natureza abiótica. Ocorrem mudanças em atividades de proteínas importantes no metabolismo secundário e dentre elas as PR's, que podem limitar o desenvolvimento do patógeno (VAN LOON, 2006). Essas proteínas atuam diretamente no sítio de infecção afetando o patógeno, suas formas extracelulares são capazes de degradar as hifas invasoras, enquanto que as intracelulares atuam tardiamente no processo de defesa. As PR's são caracterizadas por serem estáveis em pH baixo, elevadas temperaturas e por apresentarem massa molecular variando de 8 e 50 kDa (STINTZ *et al* 1993; MARTINS, 2008). Uma das particularidades destas proteínas é que elas podem se acumular em um local distinto do sítio de infecção, diferente das fitoalexinas que são produzidas próximas ao local da infecção. (DELANEY, 1997; RYAL *et al* 1996). A ativação desses elementos em resposta a uma invasão é dita Resistência Sistêmica Adquirida (RSA), tal mecanismo pode ser entendido por defesa induzida por fatores bióticos ou abióticos em um amplo espectro de microorganismos (BARROS *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2008)

Processos relacionados à HR incluem influxos de íons através da membrana plasmática, que produz espécies reativas de oxigênio do inglês *oxygen reactive species* (ROS's) devido a explosão do metabolismo oxidativo (MacMillan, 2002). As ROS's produzem danos irreversíveis, dentre os principais a oxidação de proteínas e quebra da molécula de DNA (AGUIRRE, *et al* 2005). Este mecanismo também auxilia o fortalecimento

da parede celular, peroxidação de lipídeos e regulação da expressão gênica (ALMAGRO *et al.*, 2009).

Apesar de todo o arsenal de defesa apresentado pela planta, os fitopatógenos também dispõem de mecanismos de ataques, que interferem ou suprimem as respostas de defesa do hospedeiro levando à manifestação de sintomas típicos da doença. Os fitopatógenos produzem toxinas, secretam enzimas líticas extracelulares e liberam fatores de virulência nos meios extra e intracelular da planta hospedeira. Este tipo de interação está sob um constante processo de coevolução, evento caracterizado por mudanças adaptativas em ambos os organismos na busca pela sobrevivência (SACRISTÁN; GARCÍA-ARENAL, 2008; OTTMANN *et al.*, 2012)

### **2.3. Histórico e aspectos econômicos da vassoura-de-bruxa do cacau**

A doença vassoura-de-bruxa do cacau (*Theobroma cacao* L.) é causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Singer (AIME e PHILLIPS-MORA, 2005). É uma das mais importantes doenças do cacau (*Theobroma cacao* L.), com ocorrência reportada inicialmente no Suriname em 1895 (HOLLIDAY, 1952) e após nas Ilhas Caribenhas, alguns países da América central e do Sul (PEREIRA *et al.*, 1989)

No Brasil ocorre na bacia amazônica, onde é endêmica, e no sul da Bahia, reportada pela primeira vez em 1989, marcando o início da disseminação da doença nas lavouras de cacau do Sul da Bahia (PEREIRA *et al.*, 1989). A doença é considerada uma das mais destrutivas do cacau (FERRAZ, 1989), podendo afetar a sua produção diretamente, atacando frutos e, indiretamente, as almofadas florais e os lançamentos (BAKER; CROWDY, 1943; BAKER; HOLLIDAY, 1957). Em condições ambientais favoráveis ao patógeno, a doença pode ocasionar perdas dos frutos superiores a 90% (EVANS, 1981). Assim, os fatores preponderantes, que desencadearam o processo de declínio econômico na região, foram justamente às condições climáticas favoráveis, resultando em rápida propagação da doença na região, promovendo a queda da produção e conseqüentemente o êxodo rural na região (TREVISAN, 1996). Todos esses fatores culminaram em uma crise econômica bastante grave que afetou diretamente os cacauicultores e indiretamente a cadeia produtiva da região sul da Bahia que até então era baseada na cacauicultura.

Desde a introdução da doença na Bahia, foram relatados danos de até 100% em muitas plantações e redução de até 75 % na produção de cacau, a qual passou de 400 mil

toneladas no ano de 1998 para apenas 100 mil toneladas no ano 2000 Assim, a contribuição brasileira da produção de cacau caiu de 15 % para 4,3 % entre 1989 a 1998 (PERES FILHO, 1998). Esta diminuição na produção de cacau tornou o Brasil um país importador de cacau e derivados, sendo que a exportação brasileira teve seu auge em 1979, chegando a US\$ 922 milhões, sendo US\$ 456 milhões em amêndoas e US\$ 466 milhões em derivados, e atingiu o seu pior índice de exportação nos anos 2000 com apenas US\$ 161 milhões. Em contrapartida, as importações atingiram 77 mil toneladas em 1999. Mesmo com a recuperação das lavouras a partir de métodos de controle baseados no uso de clones resistentes, este índice caiu para 24 mil toneladas em meados de 2005 (Fonte: [http://www.ceplac.gov.br/radar/mercado\\_cacau.htm](http://www.ceplac.gov.br/radar/mercado_cacau.htm)). Dados mais recentes, referentes à safra de 2012 a 2013 da produção mundial de cacau revelam a marca de 3,931 milhões de toneladas de amêndoas, mas não foi suficiente para suprir a demanda a qual alcançou 4,091 milhões de toneladas (ICCO, 2013). Já a produção Brasileira continua se recuperando como observado pelos dados da ICCO (*International Cocoa Organization*) referentes às safras de 2012/2013, as quais atingiram a marca de 240.402 toneladas para a produção nacional e 180.527 toneladas para a produção Baiana.

Apesar dos esforços a produção de cacau ainda não atingiu as marcas de produção alcançadas no pico produtivo de 1988 onde foram produzidas quase 400 mil toneladas da amêndoa ([http://www.ceplac.gov.br/radar/mercado\\_cacau.htm](http://www.ceplac.gov.br/radar/mercado_cacau.htm)). Esses dados sugerem que, mesmo com os avanços obtidos com os estudos no controle da doença, ainda falta muito para que ocorra a total recuperação da economia baseada na cacauicultura.

#### **2.4. Ciclo de vida do *M. pernicios***

*Moniliophthora pernicios* é um fungo da classe Basidiomycetes, ordem Agaricales, família Tricholomataceae. Seu ciclo de vida possui duas fases distintas, uma fase parasítica (monocariótica) e outra saprofítica (dicariótica) (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005)

Os basidiósporos de *M. pernicios* são os únicos propágulos infectivos do patógeno (EVANS, 1980), os quais são dispersos pelo vento e germinam na superfície de tecidos meristemáticos do cacau, como almofadas florais, frutos, ramos e lançamentos foliares. A invasão do tecido se dá por meio de penetração direta por estômatos ou através de ferimentos na base de tricomas e nos tecidos meristemáticos, como cortes e lesões (SREENIVASAN, 1989; PURDY e SCHMIDT, 1996). Os tecidos inicialmente infectados apresentam respostas

características, como hipertrofia e anomalias nas almofadas florais, dando origem a frutos com má formação e paternocárpicos conhecidos como frutos “morango e cenoura”, ocorrem também superbrotamentos e perda da dominância apical (KRUPASAGAR e SIQUEIRA, 1969, SILVA et. al., 2002), sendo que o broto infectado cresce com características sadias e vigorosas, reconhecidas como vassoura verde, resultante do desenvolvimento do micélio parasítico (LAWRENCE e CAMPELO, 1991). Estes sintomas podem variar conforme o tipo de cultivar, tecido infectado bem como seu estágio de desenvolvimento. Plântulas inoculadas podem apresentar variações na expressão desses sintomas como descoloração, intumescimento da gema apical e queima de expansões laminares que as envolvem, não devendo ser confundido com reação de hipersensibilidade (HR). Alguns genótipos podem apresentar alongamento de internódios, crescimento acentuado da plântula, cancro e vassouras cotiledonares (SILVA et. al., 2002).

O micélio biotrófico é monocariótico, não apresenta grampos de conexão, e possui crescimento intercelular (EVANS, 1980, 1981; LAWRENCE, *et al.*, 1991). Após um período de desenvolvimento, o micélio começa sua dicarionização com a formação de grampos de conexão nas hifas monocarióticas. O micélio dicariótico se desenvolve intracelularmente induzindo apoptose e necrose causando morte dos tecidos e a formação de “vassouras secas”. (SUÁREZ, 1993). Após períodos de dias secos seguidos por dias chuvosos formam-se os corpos de frutificação de *M. perniciosa* no tecido morto, dando origem aos basidiomas (WHEELER, 1985, ALMEIDA, *et al.* 1995), que em seguida esporulam, geralmente no período noturno com temperaturas mais baixas e maior umidade. Os basidiósporos são dispersos preferencialmente pelo vento ou por material biológico contaminado (GARCES, 1947, BASTOS, 1990). O tempo médio necessário de formação de vassouras verdes até seu secamento é de 8 semanas, e da fase de dormência até a produção de basidiomas em vassouras secas pode levar 13 semanas totalizando uma média de 21 semanas para o fungo completar seu ciclo (LUZ et. al., 1994).

## **2.5. Resistência à vassoura-de-bruxa**

De acordo com Flor (1971), ou a teria gene-a-gene, a manifestação da resistência é o resultado de uma interação incompatível entre um gene de resistência, dominante na planta (R) e um gene de avirulência dominante no patógeno (Avr). A resistência genética de plantas a fitopatógenos pode ser classificada de acordo com o número de genes envolvidos. As

características que são controladas por vários genes são denominadas poligênicas, da mesma forma as controladas por um só gene, são chamadas de monogênicas. (CAMARGO, 1995)

A Resistência genética, concomitante ao manejo integrado, é uma importante alternativa de controle para as doenças que afetam o cacaueteiro. Programas de melhoramento genéticos têm investido na identificação e seleção de genótipos de cacaueteiros resistentes a vassoura-de-bruxa. A CEPLAC, através do programa de melhoramento do cacaueteiro visando resistência a vassoura-de-bruxa, já gerou mais de 30 mil árvores, tendo testado mais de 500 clones. Culminando na distribuição aos produtores de 39 clones e três híbridos de cacaueteiro com diferentes níveis de resistência à doença (LOPES *et al.*, 2011). Entretanto alguns materiais genéticos mais produtivos, embora apresentem bons níveis de resistência na copa, ainda mostram alguma suscetibilidade em frutos. Portanto, o principal desafio do programa de melhoramento do cacaueteiro é desenvolver cultivares com resistência durável. Para atingir esse objetivo, ferramentas de biologia avançada como genômica, proteômica e metabolômica- as ômicas - estão sendo aplicadas de forma integrada, a fim de superar os desafios biológicos e acelerar o desenvolvimento e a disponibilização, para a sociedade, de cultivares competitivas (MICHELI *et al.*, 2010).

Nos últimos 10 anos, o CEPEC (em convênio com outras instituições públicas no Brasil e no Exterior) tem desenvolvido e participado de projetos de genômica funcional e de proteômica, os quais incluem a construção de bibliotecas EST (*Expressed Sequence Tags*) e BAC, sequenciamento do genoma do cacaueteiro e do fitopatógeno *M. perniciosa*, estudos de expressão dos diversos órgãos do cacaueteiro desafiado com os principais agentes patogênicos (*M. perniciosa*, *Ceratocystis cacaofunesta*, *Phytophthora* spp.) ou a outros agentes (ácido salicílico e jasmônico) (JOSEPH *et al.*, 2004). Estes estudos têm permitido conhecer e explorar diversas fontes de resistência do cacaueteiro e do patógeno. Neste sentido, diversos programas envolvendo, genética/genômica do cacaueteiro, de *M. perniciosa* e da interação foram desenvolvidos com o objetivo principal de identificar *Quantitative trait loci* (QTLs) (BROWN *et al.*, 2005; FALEIRO *et al.*, 2006, JUCA *et al.*, 2014 ) e genes a partir de ESTs e proteínas envolvidas na resistência da planta e/ou na patogenicidade do fungo (JONES *et al.*, 2002, ARGOUT *et al.*, 2008, LIMA *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2009 LIMA *et al.*, 2010, MICHELI *et al.*, 2010; LEMOS *et al.*, 2010,). Dentre os programas de melhoramento do cacaueteiro, destaca-se o programa de genômica funcional da interação cacau- *M. perniciosa* da CEPLAC-BA em colaboração com o Cirad e a UESC. ESTs foram obtidos de ápices caulinares de TSH 1188 (resistente) e Catongo (susceptível) (GESTEIRA *et al.*, 2007; LEAL *et al.* 2007) e de frutos de TSH 1188 e de SCA 6 (Projeto CEPLAC/CEPEC); e de genótipos de cacaueteiro de diferentes origens, não descendente do genótipo Scavina-6 e com diferentes

níveis de resistência à vassoura-de-bruxa (LEMOS *et al.*, 2010; Projeto CEPLAC/CEPEC). Vários trabalhos têm sido realizados com o intuito de compreender melhor os mecanismos de resistência envolvidos neste patossistema. (LEAL *et al.* 2007; GESTEIRA *et al.* 2007).

Diante da grande demanda de informações sobre os mecanismos bioquímicos e moleculares da interação no patossistema cacau- *M. perniciosa* e a necessidade de estudos envolvendo outros patógenos, inúmeros projetos de sequenciamento de DNA foram executados, incluindo: o projeto genoma do fungo que envolveu o sequenciamento de bibliotecas *shot gun* de DNA genômico com 1.5X a cobertura do genoma (MONDEGO *et al.*, 2008); o sequenciamento de cDNA obtidos de diferentes fases do ciclo de vida do fungo (PIRES *et al.*, 2009); o sequenciamento de bibliotecas de cDNA da interação cacau-*M. perniciosa* (GESTEIRA *et al.* 2007). Além disso, em 2009 foi disponibilizado pelo CIRAD/França (<http://esttik.cirad.fr>), um banco de dados de ESTs de *T. cacao* desenvolvido com a participação da CEPLAC e UESC (ARGOUT *et al.*, 2008) com cerca de 48.500 unigenes. Também foi disponibilizado o genoma completo de dois genótipos de *T. cacao*: o matina, sequenciado com a colaboração de instituições públicas e privadas (MARS, USDA-ARS, IBM, NCGR, Clemson University, HudsonAlpha Institute for Biotechnology, Indiana University and Washington State University) e o criollo sequenciado pelo CIRAD em colaboração com outros países inclusive o Brasil através da CEPLAC (ARGOUT *et al.* 2011). Esses bancos de dados abrem caminho para uma vasta gama de investigações no contexto da pós-genômica, no entanto, mesmo com os estudos genéticos e sequenciamentos de nucleotídeos feitos para diversos organismos, estes em si não são suficientes para o total entendimento destas relações complexas (PANDEY, A.; MANN, M., 2000).

Desde que o sequenciamento do genoma de *Haemophilus influenzae* foi concluído em 1995 (Fleischmann *et al.*, 1995), o número de sequências de genoma à disposição do público tem aumentado exponencialmente. Com a introdução das tecnologias de sequenciamento de quarta geração, nesses últimos anos, os depósitos diários de novas sequências nos bancos de dados têm sido numerosos. Com isto, a identificação das proteínas de um mapa proteico a partir dos peptídeos obtidos por MS/MS tem sido cada vez mais precisa, favorecendo o interesse em análises de proteomas, visto que, através de informações do sequenciamento de um organismo pode-se deduzir proteínas codificadas num genoma, o que é de fundamental auxílio no processo de identificação pela análise proteômica (JUNGBLUT e WITTMANN-LIEBOLD, 1995).

Nesse sentido, os bancos de dados genômicos de *T. cacao* e do fungo *M. perniciosa* ampliam as perspectivas para estudos que envolvem busca de novos genes potencialmente envolvidos com resistência da planta a estresses abióticos e bióticos, bem como aqueles

envolvidos e/ou associados a características agronômicas de interesse, a exemplo da qualidade do licor de cacau utilizado na fabricação de chocolate, principal subproduto do cacau.

## 2.6. Proteômica da interação em cacau

O cacau tinha recebido pouca atenção no que se refere às pesquisas proteômicas, até a instalação da Rede Proteômica do Estado da Bahia, com apoio da FINEP e FAPESB em 2004. Até o momento foram conduzidos poucos estudos para analisar variações no padrão proteico, durante infecções com patógenos ou pragas. Santiago (2010) identificou proteínas-PR em vassouras-verdes dos genótipos Catongo (suscetível) e TSH 1188 (resistente) em banco de germoplasma, e Mendes (2010) estabeleceu um método para extração de drusas de oxalato de cálcio em vassoura e identificou potenciais componentes proteicos da matriz dessas drusas. Atualmente, análises proteômicas diversas envolvendo respostas a estresses bióticos e abióticos em *T. cacao* foram iniciados no Centro de Biotecnologia e Genética da UESC (ALMEIDA, D. M., 2012; DIAS, C. V., *et al* 2011).

Estudos envolvendo a proteômica de interação em outras culturas foram conduzidos com sucesso, como a análise do proteoma da interação tomateiro-*Fusarium oxysporum*, o qual identificou várias proteínas PR na seiva do xilema (HOUTERMAN *et al.*, 2007). E os estudos da interação *Arabidopsis thaliana*-*Alternaria brassicicola*, onde respostas de defesa provocadas por elicitores, em meio de cultura, foram estudadas por Chivasa *et al.* (2006).

O uso da Eletroforese bidimensional (2-DE-*bi-Dimensional-Electrophoresis*) juntamente com a Espectrometria de Massas cria condições para a elucidação de muitas questões ainda em aberto sobre mecanismos da interação no patossistema *M. perniciosa*-cacaueiro. Assim, a identificação de proteínas diferencialmente acumuladas relacionadas na interação hospedeiro-patógeno aumenta de forma significativa, tornando possível contrastar o perfil proteômico de plantas infectadas e a situação controle (não infectado) em diferentes estágios da infecção (ZHOU *et al.* 2006). Este tipo de estudo é amplamente realizado para verificar modificações no proteoma de plantas infectadas por fitopatógenos, onde tem sido identificadas uma série de proteínas associadas a interação como PR`s e peroxidases que são expressas diferencialmente nestas situações (FANG *et al.*, 2012; ZAMANY *et al.*, 2012; MANDELIC *et al.*, 2013).

Ao contrário de estratégias moleculares que visam o estudo de genes e analisam o seu perfil de expressão, a proteômica avança no sentido de identificar proteínas secretadas e endógenas, e se faz de extrema importância no entendimento de diversos processos. A proteômica pode quantificar, localizar, determinar modificações pós-traducionais e, principalmente, atribuir função às proteínas identificadas, assim como construir mapas de interações protéicas. Esta técnica é aplicada na elucidação de processos fisiológicos (CARBERRY *et al.* 2006), na localização de proteínas em diferentes tecidos (CAPRIOLI *et al.* 1997; CHAURAND *et al.* 2004), na análise de interações proteína-proteína (ARENKOV *et al.* 2000; JACKMAN *et al.* 2008), na caracterização de diferentes compartimentos celulares (EUBEL *et al.* 2008).

Estudos envolvendo a proteômica têm crescido expressivamente nos últimos anos, tendo como fatores contribuintes o constante aprimoramento de ferramentas, softwares, técnicas de coloração de géis, bem como identificação de peptídeos de forma rápida e precisa, através de Espectrometria de Massas. A junção desses fatores torna a proteômica um campo de estudos promissor.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Material vegetal**

Progênes de dois clones de cacauzeiros (TSH 1188 e Catongo) provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), em Ilhéus, BA, foram obtidas a partir do plantio de 2223 sementes de cacau, das quais, 1107 oriundas do genótipo CATONGO (suscetível) e 1116 do genótipo TSH 1188 (resistente), respectivamente padrão de suscetibilidade e resistência à vassoura-de-bruxa do cacauzeiro.

As sementes foram obtidas de frutos de polinização livre do BAG/CEPEC foram pré-germinadas por 48 horas em serragem esterilizada umedecida. Após esse período, foram plantadas em tubetes plásticos contendo aproximadamente 300g de terriço esterilizado. As plântulas foram mantidas em condições de casa de vegetação, com irrigação por 15 minutos, três vezes ao dia (às 8, 12 e 16h).

#### **3.2. Obtenção de inóculo**

O inóculo (4145) utilizado foi oriundo de vassouras secas de cacauzeiros do tipo comum coletadas em uma área de plantio do CEPEC. As vassouras secas coletadas foram trazidas para o laboratório, desinfestadas com lavagens rápidas em hipoclorito de sódio a 0,1% e penduradas em arames esticados horizontalmente sob um telado (vassoureiro), e então submetidas a um regime diário de 8 h de molhamento e 16 h de secamento.

Os basidiomas foram coletados, lavados sequencialmente em água destilada, em solução de cloranfenicol ou streptomina a 1%, e mais duas vezes em água destilada esterilizada. Em seguida, foram secos com folhas de papel absorvente. Dos basidiomas enxutos, retirou-se o píleo, com auxílio de escalpelo e pinça. Em seguida, os píleos foram fixados com vaselina pastosa (Silinol SG) em tampas de vidro, com o himênio voltado para baixo, sobre um béquer contendo solução MES (ácido etanolsulfônico) em glicerol a 16%, pH 6,2, sob agitação constante. O cálculo da concentração dos basidiósporos nas suspensões obtidas foi realizado através de um contador de esporos ou células (Coulter counter). As

suspensões de basidiósporos foram acondicionadas em recipientes plásticos de 2 mL e armazenadas em nitrogênio líquido conforme metodologia descrita por Dickstein *et al.* (1990), até o momento da inoculação. Antes de estocar, uma alíquota de 25 µL de cada uma das suspensões de basidiósporos obtidas foi retirada e espalhada com bastão de vidro sobre a superfície do meio ágar-água a 2% em placas de petri de 5 cm de diâmetro para avaliar a germinação dos basidiósporos. Decorridas seis horas de incubação a 25°C, as placas eram retiradas, procedia-se à leitura ao microscópio ótico e determinava-se a porcentagem de basidiósporos germinados no momento da estocagem e vinte e quatro horas antes da inoculação, uma nova alíquota de 25 mL era coletada das suspensões estocadas procedendo-se igualmente o teste de germinação e determinação da variabilidade do inóculo.

### 3.3. Inoculação

As plântulas de cacauieiro mantidas em casa de vegetação tiveram 2/3 do tamanho das folhas cortado a fim de acelerar o crescimento apical (Figura 1). As plântulas de cada tratamento foram inoculadas com uma gota de 20 µL da suspensão de inóculo na concentração de  $2 \times 10^5$  basidiósporos/mL, depositada na gema apical das plântulas. As inoculações foram conduzidas utilizando o método de gota (SURUJDEO-MAHARAJ *et al.*, 2003; SENA *et al.*, 2014) na concentração  $2 \times 10^5$  basidiósporos/mL (DICKSTEIN *et al.*, 1987).

As plântulas testemunhas de cada progênie receberam em lugar do inóculo uma gota de agar-água a 0,3% (Figura 1-C; D), as quais também foram levadas a câmara úmida para igualar as condições de ambos os tratamentos. Após a inoculação, as plântulas de todos os tratamentos permaneceram por 24 h em câmara úmida, com temperatura em torno de 25°C e UR de 100%, sendo então transferidas para a casa de vegetação climatizada onde permaneceram até o final do experimento.

### 3.4. Delineamento experimental

Foram realizadas coletas de meristema apical inoculados e não inoculados dos genótipos Catongo e TSH 1188, 6, 12, 24, 48, 72 horas pós-inoculação (HAI); 7, 15, 30, 45, 60, e 90 dias pós-inoculação (DAI) (figura 1).



Figura 1. A: Pré-germinação de sementes de cacau em substrato. B: Redução de folhas de progênies de cacau. C: Plântulas acomodadas em câmara úmida. D: Inoculação de plântulas por gotejamento. E: Coleta de ápices caulinares.

Para obtenção do perfil proteico foram tomados 4 pontos de coleta. O ponto 1 corresponde as amostras coletadas em 6 e 24 HAI, o ponto 2, composto por amostras coletadas em 72 horas, o ponto 3 aos 45 DAI e o ponto 4 com 60 DAI.

### 3.5. Extração proteica

Os meristemas apicais do genótipo Catongo correspondentes aos pontos de coleta 1, 2, 3 e 4 foram submetidos a extração proteica baseada no protocolo desenvolvido por Pirovani

*et al.* (2008). Os meristemas foram macerados utilizando um almofariz em presença de nitrogênio líquido e *Polyvinylpolypyrrolidone* (PVPP) até atingirem a textura de um pó fino e distribuídos em tubos de centrífuga de 50ml (média de 0,214g por ponto). O material vegetal foi lavado utilizando acetona 100% gelada contendo  $\beta$ -mercaptoetanol 0,07%, procedido de centrifugação a 4°C por 10 minutos a 14.000 rpm, essa etapa foi repetida 4 vezes. O precipitado obtido foi seco em câmara de fluxo laminar a temperatura ambiente por 30 minutos, este foi lavado em acetona contendo ácido tricloroacético (TCA) 10 %, com  $\beta$ -mercaptoetanol 0,07 %, por 3 vezes, até que o mesmo perdesse a coloração. Cada lavagem foi seguida de homogeneização em vortex e sonicação (4 ciclos de 10 segundos alternado com 10 segundos de repouso, com amplitude de 70 %), o *pellet* foi então lavado com solução de TCA 10% em água com  $\beta$ -mercaptoetanol 0,07 % por 3 vezes, homogeneizado, sonicado e centrifugado nas mesmas condições citadas anteriormente, e lavado por 2 vezes com acetona 80% com  $\beta$ -mercaptoetanol 0,07 %. Cada lavagem foi seguida de descarte do sobrenadante e homogeneização por pipetagem e quando necessário, em vortex por 1 minuto. O *pellet* obtido foi então espalhado na parede do tubo e seco a temperatura ambiente.

Etapa de extração SDS/fenol: Um volume de 3 ml de Tampão SDS-denso (Tris-HCl 100 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0, sacarose 30 %, SDS 2 % e  $\beta$ -mercaptoetanol 5 %) foi adicionado ao pó seco obtido da etapa anterior e sonicado rapidamente para homogeneização ( 4 ciclos de 10 segundos alternado com 10 segundos de repouso, com amplitude de 50 %), a essa solução adicionou-se 3 ml de fenol 99% tamponado em pH 8,0 com Tris. O material foi homogeneizado em vortex por 1 minuto e deixou-se descansar por 30 minutos. O conteúdo foi dividido em microtubos de 2ml, centrifugado a 4°C por 10 minutos a 10.000 rpm. A fase fenólica contendo as proteínas foi então retirada e acondicionada em um novo tubo e foram adicionados 5 volumes de acetato de amônio 0,1 mmol.L<sup>-1</sup> em metanol gelado e deixados a -20 °C *overnight*. As proteínas foram recuperadas por centrifugação, em seguida foram lavadas por 2 vezes com acetato de amônio 0,1 mmol.L<sup>-1</sup> em metanol gelado, sendo o *pellet* ressuspenso e centrifugado a cada lavagem sob as mesmas citadas anteriormente. Posteriormente o material foi lavado em acetona 80% por 2 vezes nas mesmas condições anteriores. O *pellet* foi seco a temperatura ambiente e em seguida ressuspenso em 600 $\mu$ l de tampão de reidratação ( Ureia 7M, Tiourea 2 M, CHAPS 2 %, Azul de Bromofenol 0,002%). As proteínas ficaram solubilizando em tampão *overnight* dentro da geladeira e então estocadas no -20 °C.

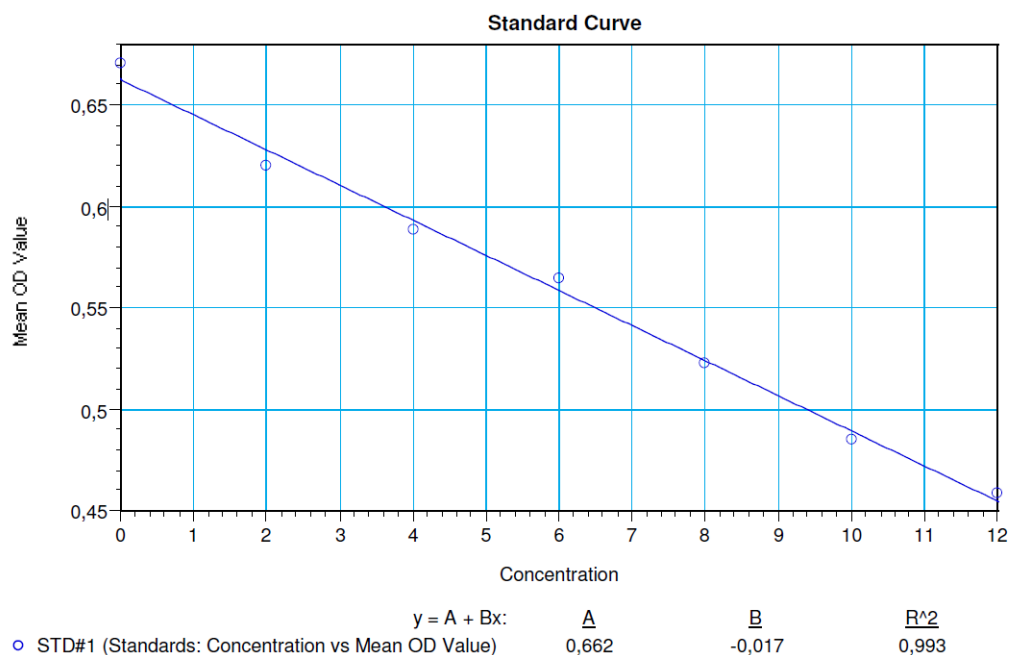
### 3.6. Dosagem de Proteínas

As proteínas obtidas durante o processo de extração SDS-denso/fenol, foram dosadas com o 2D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences). Uma curva padrão foi preparada com base nas concentrações de soro albumina bovina (BSA), que serviu como base de dosagem para a quantificação do extrato proteico de ápices caulinares. A curva padrão e bem como as amostras proteicas foram preparadas em triplicata em microtubos, sete pontos para a curva padrão (Tabela 1) de BSA. Três microlitros das proteínas ressuspensas em tampão de reidratação foram utilizadas nas triplicatas, sendo a estas adicionado 100  $\mu\text{L}$  de solução precipitante, incluindo o padrão, e brevemente homogeneizados em vortex. Essa solução foi incubada a temperatura ambiente entre 2 a 3 minutos. Cem  $\mu\text{L}$  de solução co-precipitante foram adicionados a cada tubo e homogeneizados por inversão, logo após, submetidos a centrifugação a  $4^\circ\text{C}$  por 15 minutos a 13400 rpm. O sobrenadante foi descartado e outra centrifugação rápida (*spin*) foi executada para eliminar traços do sobrenadante. Ao *pellet* foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de solução de cobre e 100  $\mu\text{L}$  de água deionizada seguido de homogeneização em vortex para dissolução do precipitado. Um volume de 250  $\mu\text{L}$  do “reagente de cor de trabalho” foram adicionados e misturados por inversão, essa solução foi incubada por 15 a 20 minutos a temperatura ambiente. As soluções foram transferidas para microplacas ELISA e submetida a leitura em espectrofotômetro, gerando uma curva padrão (Figura 2). A tabela 3 mostra os valores de concentração obtidos para as amostras.

**Tabela 1.** Série preparada para obtenção da curva padrão.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7
Vol.BSA (2 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ *)	0	1	2	3	4	5	6
$\mu\text{g}$ proteínas	0	2	4	6	8	10	12

\* volume em  $\mu\text{L}$



**Figura 2.** Curva padrão de BSA, obtida utilizando 2D Quant Kit (GeHealthCare) segundo recomendações do fabricante, A imagem foi gerada pelo SoftMax Pro 4.8, a partir das leituras de ABS ABS480 nm, realizada no espectrofotômetro Versamax (Molecular Devices).

### 3.7. Eletroforese 1D

Para eletroforese 1D, os extratos proteicos foram submetidos diretamente ao SDS-PAGE em minicubas de eletroforese (Omniphor) com géis de 8 x 10 cm, contendo 12,5% de acrilamida. Para a análise do extrato proteico foi utilizando uma alíquota de 20 µg de proteínas obtidas pelo método de extração do fenol/SDS-Denso para verificar a qualidade do perfil proteico dos ápices caulinares.

### 3.8. Focalização isoeétrica (primeira dimensão)

Para essa etapa, um total de 500 µg de proteínas previamente solubilizadas em tampão de reidratação no qual foi adicionado DTT a concentração de 50 mmol.L<sup>-1</sup> e 0,5 % de anfólitos para pH 3-10NL, a esta solução foi adicionado mais tampão de reidratação até o volume de 250 µl.

As amostras proteicas foram pipetadas em suporte específico para focalização

conhecidos como “sarcófagos” (strip holder) de forma que as extremidades positivas e negativas dentro dos mesmos sejam conectadas pela solução. Posteriormente as tiras de gel (*strips*) com gradiente de pH imobilizado 3-10NL, 13cm (Immobiline Dry Strip Gel) sendo a parte do gel colocada virada para baixo em contato direto com a amostra, por conseguinte, 1 mL de óleo mineral (DryStrip Cover Fluid) foi colocado sobre as *strips* para evitar possível desidratação da mesma.

Os *strip holders* foram alocados diretamente na unidade de focalização isoeletrica Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare), controlada pelo software Ettan IPGphor 3 com as seguintes configurações:

Tempo de reidratação- 12 horas a 20°C;

Condições de corrida- 500Vh por 1 hora, 1000Vh por 1:04 h, 8000Vh por 2:30 h e 8000Vh por 40 minutos.

### **3.8.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (segunda dimensão)**

#### **3.8.1.1. Preparação de *strips***

Após focalizadas, as *strips* foram preparadas para a segunda dimensão sendo transferidas para tubos de ensaio, onde foram adicionados 7 ml de tampão de equilíbrio (6 M de ureia, 75 mmol.L<sup>-1</sup> de Tris-HCl pH 8.8, 30 % de glicerol, 2% SDS, 0.002% de azul de bromofenol) contendo DTT 10 mg/mL, sendo equilibradas por agitação suave durante 15 minutos. Essa fase ajuda a reduzir as pontes de dissulfeto presentes nas proteínas em conformação terciária e quaternária. Após a primeira etapa de equilíbrio, a solução contendo DTT foi descartada e recipientes adequados e uma nova solução de tampão de equilíbrio contendo iodoacetamida 25 mg/mL foi adicionada aos tubos de ensaio e então agitadas suavemente por 15 minutos. Nesta etapa as proteínas foram alquiladas. Prosseguiu-se então a ultima etapa de equilíbrio onde a solução contendo iodoacetamida foi descartada em recipiente adequado e foram adicionados 7 ml de tampão de corrida 1X (Tris 0,25 M, glicina 1,92 M, SDS 1%, pH 8,5), seguindo agitação por 15 minutos.

### 3.8.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (segunda dimensão)

Para a realização da segunda dimensão, Os géis SDS-PAGE foram submetidos à corrida eletroforética em cuba de eletroforese SE 600 Ruby (GE Healthcare). Os géis de poliacrilamida 12,5 % foram confeccionados em triplicata para cada tratamento, utilizando soluções de acrilamida/bisacrilamida 30 % (29,2 g de acrilamida e 0,8 g de N-metil-bisacrilamida), tampão de resolução 1X (Tris-HCl, 0,375 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8,8, SDS 0,1 %) 60 µL de persulfato de amônio 10 % e 6 µL de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina). Após a polimerização dos géis, 700 µL de solução selante (25 mmol.L<sup>-1</sup> de tris base, 192 mmol.L<sup>-1</sup> de glicina, 0,1% de SDS, 0,5% de agarose, 0,002% de bromophenol blue) foi adicionado aos géis, sobre esta solução foi colocado um pedaço de papel filtro contendo o marcador de peso molecular, Amersham Low Molecular Weight SDS Calibration Kit for SDS electrophoresis (GE Healthcare). As *strips* foram dispostas na parte superior do gel, sendo as extremidades positivas direcionadas a mesma posição. Adicionou-se então a solução selante cobrindo toda a *strip*. Procedeu-se com a montagem da cuba e a adição de tampão de corrida 1X (Tris Base 25 mol.L<sup>-1</sup>, glicina 0,192 mol.L<sup>-1</sup>, dodecil sulfato de sódio – SDS - 1%) seguindo-se posteriormente a aplicação do programa de eletroforese obedecendo os seguintes parâmetros: 15 mA/gel por 15 minutos, seguida de 40 mA/gel por 30 min e por fim 50 mA/gel por 3 horas ou até que ocorra toda a migração da amostra no gel, que pode ser acompanhada observando o deslocamento do marcador no gel.

Ao fim da corrida os géis foram retirados da cuba e imersos em tampão de fixação (etanol 40 % e ácido acético 10 %) por 1 hora, seguindo-se a retirada do tampão de fixação e a imersão em corante azul de coomassie coloidal (sulfato de amônio 8 %, ácido fosfórico 0,08%, Coomassie Blue G-250 0,08% e 20% metanol). Os géis ficaram em contato com o corante por 7 dias sob agitação leve, após esse período o corante foi retirado e adicionou-se água destilada autoclavada realizando trocas diárias ao decorrer de 5 dias.

### 3.9. Obtenção de imagens e análise estatística



Os géis (triplicatas) foram digitalizados, utilizando o ImageScanner III (GE Healthcare), usado para aplicações densitométricas, seguindo-se então as análises no software Image Master 2D Platinum (GE Healthcare) para a avaliação das modificações, considerando área e intensidade, das proteínas representadas pelos *spots* que ocorrem entre os tratamentos nos géis. As comparações foram feitas dentro do genótipo, comparando o tratamento inoculado com o não inoculado no mesmo tempo de coleta. O cálculo de ANOVA foi utilizado para identificar os *spots* diferencialmente expressos entre as comparações citadas anteriormente. Foram considerados como diferencialmente expressos os *spots* que tiveram valores de  $p \leq 0,05$  e variação de intensidade (razão)  $\geq 1,5$  (*Fold change*) para mais ou para menos. Uma análise multivariada foi realizada para visualizar de forma global as mudanças dos genótipos em resposta ao fungo. Os valores dos *spots* dentro das triplicatas foram submetidos à análise estatística na ferramenta online NIA *array analysis tool* (<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/>) baseada na análise de variância ANOVA, seguindo os seguintes parâmetros: transformação logarítmica no arquivo de entrada “Log2”, modelo de erro “max (*average, actual*)”, proporção de valores mais elevados de variância a serem removidos antes de variação média “0.01”, 10 graus de liberdade para o modelo de erro bayesiano, 0.05 FDR limite e permutações zero. A análise de componente principal (PCA) foi realizada para identificar as diferenças genotípicas e experimentais, usando as seguintes configurações: Tipo de matrix “correlação”, três componentes principais, 1.5- variação limite para clusters, e 0.5 de limite de correlação para clusters.

### **3.10. Extrações de peptídeos em gel e espectrometria de massas.**

#### **3.10.1. Excisão e digestão trípica**

Os peptídeos de interesse foram excisados manualmente do gel e tratados individualmente. Inicialmente foram descorados em 200  $\mu\text{L}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a 25mM contendo acetonitrila 50 % por 16 horas, o sobrenadante foi descartado e os fragmentos de gel foram lavados com 200  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e posteriormente desidratados em 150  $\mu\text{L}$  de acetonitrila 100 % por 5 minutos e então foram secos usando centrífuga a vácuo *Concetrator 5301* (*Eppendorf*) por 20 minutos. Foram colocados 5  $\mu\text{L}$  de solução de tripsina 25 ng/ $\mu\text{L}$ , gelada, incubados a 4 °C por 10 minutos para absorção da mesma nos fragmentos de gel.

Seguiu-se com a adição de solução de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a 25mM até cobrir o gel e posteriormente foram incubados a 37 °C por 16 horas para ação da tripsina.

O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo, os fragmentos de gel que sobraram foram lavados duas vezes com uma solução de 50  $\mu\text{L}$  de acetonitrila 50 % e ácido fórmico 0,1 %, sendo agitados por 15 minutos a cada lavagem, o sobrenadante das lavagens foi transferido para o tubo que continha o sobrenadante da digestão. As amostras foram concentradas em centrífuga a vácuo até atingir o volume entre 10 e 15  $\mu\text{L}$ .

### 3.10.2. Espectrometria de massas (LC/MS/MS)

Os peptídeos foram resolvidos por cromatografia de fase-reversa no nanoAcquity UPLC (WATERS) em duas colunas C18, sendo a primeira uma coluna “trapping” de 5  $\mu\text{m}$ , 180  $\mu\text{m}$  x 20 mm e a segunda de 1,7  $\mu\text{m}$  100  $\mu\text{m}$  x 100 mm, sob um fluxo de 0,6  $\mu\text{L}/\text{min}$  em uma corrida de 50 minutos, onde foram coletados 4  $\mu\text{L}$  de cada amostra. Os peptídeos foram separados de acordo com um gradiente de acetonitrila, sendo 1 % até 1 minuto, de 1 % a 50 % em 40 minutos, de 50 % a 85 % em 5 minutos, mantendo-se nessa concentração por mais 2 minutos, voltando à concentração de 1 % em um minuto e permanecendo nessa condição por 2 minutos, totalizando 5 minutos de corrida. Os peptídeos separados foram ionizados em um capilar sob voltagem de 3000 V (*Micromass Q-TOFmicro*), fragmentados no modo positivo com seleção da intensidade relativa mínima de 10 *counts*, sendo analisados os 3 íons mais intensos por cada varredura de 1 segundo, com energia de colisão variando entre 20 e 95 eV de acordo com a relação massa/carga ( $m/z$ ) dos peptídeos. Os espectros foram analisados pelo *software ProteinLynx Global Server* v 2.3 e (WATERS) e comparados contra o banco de dados do NCBI, utilizando a ferramenta online MASCOT MS/MS *Ions Search* ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), obedecendo os seguintes parâmetros de busca: Enzima utilizada tripsina, 1 sítio de clivagem perdido, como modificação fixa foi utilizado carbamidometilação de cisteínas (Cys) e oxidação da metionina (Met) como modificação variável, 30 ppm de tolerância de erro, tolerância para erro de massa igual a 0,3 Da e 0,1 Da para erro dos íons fragmentados. Os espectros que não foram identificados pelo NCBI foram comparados com o banco de dados do *Theobroma cacao* (<http://cocoagendb.cirad.fr/gbrowse>), via *ProteinLynx*, configurado para digestão tríptica, com 1 sítio de clivagem perdida, erro tolerante de 30 ppm e tolerância para erro de massa igual a 0,3 Da.

### **3.11. Anotação funcional das proteínas.**

Para a obtenção das sequências FASTA das proteínas identificadas, foram utilizados os números de acesso gerados pelas identificações da ferramenta MASCOT no banco de dados NCBI, e para as proteínas identificadas no *ProteinLynx* as sequências foram obtidas no próprio programa. As sequências FASTA foram analisadas no software BLAST2GO (<http://www.blast2go.com/b2ghome>), que fornece informações importantes, dentre elas, funções, processos biológicos e localização celular, assim, as proteínas foram então categorizadas em oito grupos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Germinação e sintomas

Para verificar a viabilidade dos esporos no momento da inoculação, foi realizada uma leitura da porcentagem de germinação antes da inoculação e após a inoculação. Os resultados obtidos foram 95% e 85% respectivamente. Em relação à leitura da presença de sintomas nas plântulas inoculadas, com 72 HAI não foi possível verificar sintomas. Contudo, plantas com 45 DAI de ambos os genótipos apresentaram os sintomas típicos da fase biotrófica (anexo 1). A contagem de plantas quanto à presença ou ausência de sintomas mostrou que o genótipo resistente apresentou 7% de plantas mortas, 41% de plantas sintomáticas e 52% de plantas assintomáticas. O genótipo suscetível apresentou 55,4% de plantas mortas, 35,4% de plantas sintomáticas e 9% de plantas assintomáticas. As plantas não inoculadas não apresentaram nenhum tipo de sintoma.

#### 4.1.2. Obtenção de ápices caulinares e extração proteica

No mínimo 39 ápices caulinares (amostras) de cada ponto de coleta foram obtidas (Tabela 2), totalizando cerca de 550 amostras por tratamento. As mesmas foram processadas individualmente, liofilizadas e estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior uso.

**Tabela 2.** Número de ápices caulinares obtidos por ponto de coleta e discriminados por tratamento.

Coletas	Catongo		TSH 1188	
	Inoculado	Não Inoculado	Inoculado	Não inoculado
6 horas	57	57	57	57
12 horas	60	60	51	51
24 horas	57	54	66	63
48 horas	54	54	54	51
72 horas	48	51	51	51
5 dias	45	45	51	51
15 dias	45	36	39	39
30 dias	57	60	60	60
45 dias	39	39	42	39
60 dias	48	48	48	45
90 dias	48	45	45	45
<b>Total</b>	<b>558</b>	<b>549</b>	<b>564</b>	<b>552</b>

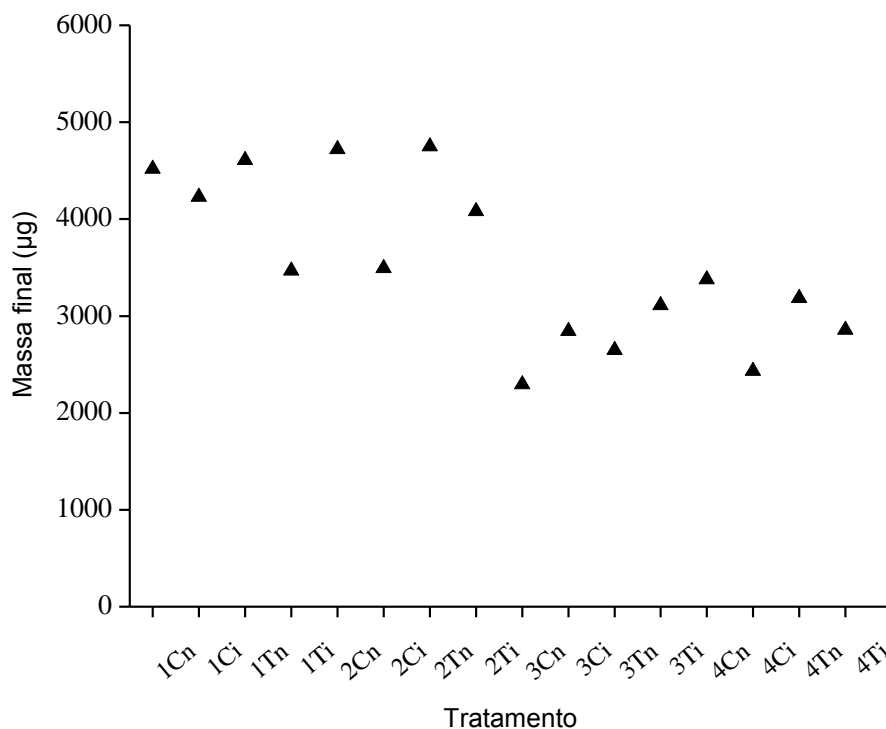
Para as coletas de ápices caulinares inoculados em 45 DAI e 60 DAI, apenas as plântulas sintomáticas foram utilizadas. Sendo coletada a região meristemática, incluindo a região adjacente (até cinco centímetros de distância do ápice caulinar) compreendendo a região onde os sintomas eram evidentes.

A concentração de proteínas dosadas variou de 3,824 a 7,683  $\mu\text{g. } \mu\text{L}^{-1}$ . A média da massa proteica total obtida ao final das extrações foi de 3538,838  $\mu\text{g}$  (Tabela 3). Observa-se que a massa proteica obtida foi maior para os tratamentos de 6+24 horas e 72 horas mesmo usando quantidade de material vegetal equivalente (Figura 3). Observando-se o gráfico da Figura 3 nota-se um agrupamento dos pontos iniciais, 1 e 2 separando-se e dos pontos finais 3 e 4 (tanto inoculados quanto não inoculados). Essa variação pode estar associada tanto a resposta metabólica das plântulas em relação à inoculação quanto ao próprio período de crescimento da plântula e desenvolvimento do tecido vegetal, já que as plântulas de 45 dias apresentam-se mais fibrosas, diferente do observado nas plântulas dos pontos iniciais.

**Tabela 3.** Massa final de proteínas obtidas a partir do material vegetal coletado por tratamento.

<b>Tratamento</b>	<b>Mat. vegetal (g)</b>	<b>Proteína (<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Curva</b>	<b>Vol. final (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Massa final (<math>\mu\text{g}</math>)</b>
Catongo 6+24 hn	0.2	7.532	0.997	600	4519.2
Catongo 6+24 hi	0.22	7.05	0.997	600	4230
TSH1188 6+24 hn	0.23	7.683	0.997	600	4609.8
TSH1188 6+24 hi	0.22	5.778	0.997	600	3466.8
Catongo 72 hn	0.21	5.903	0.997	800	4722.4
Catongo 72 hi	0.21	4.365	0.997	800	3492
TSH1188 72 hn	0.21	5.938	0.997	800	4750.4
TSH1188 72 hi	0.21	5.1	0.997	800	4080
Catongo 45 dn	0.22	3.824	0.995	600	2294.4
Catongo 45 di	0.21	4.74	0.995	600	2844
TSH1188 45 dn	0.21	4.412	0.995	600	2647.2
TSH1188 45 di	0.21	5.183	0.995	600	3109.8
Catongo 60 dn	0.22	5.632	0.997	600	3379.2
Catongo 60 di	0.22	4.056	0.997	600	2433.6
TSH1188 60 dn	0.21	5.31	0.997	600	3186
TSH1188 60 di	0.2	4.761	0.997	600	2856.6

Legenda: di= dias de inoculação; dn = dias não inoculado; hi= horas de inoculação; hn= horas nao inoculado.

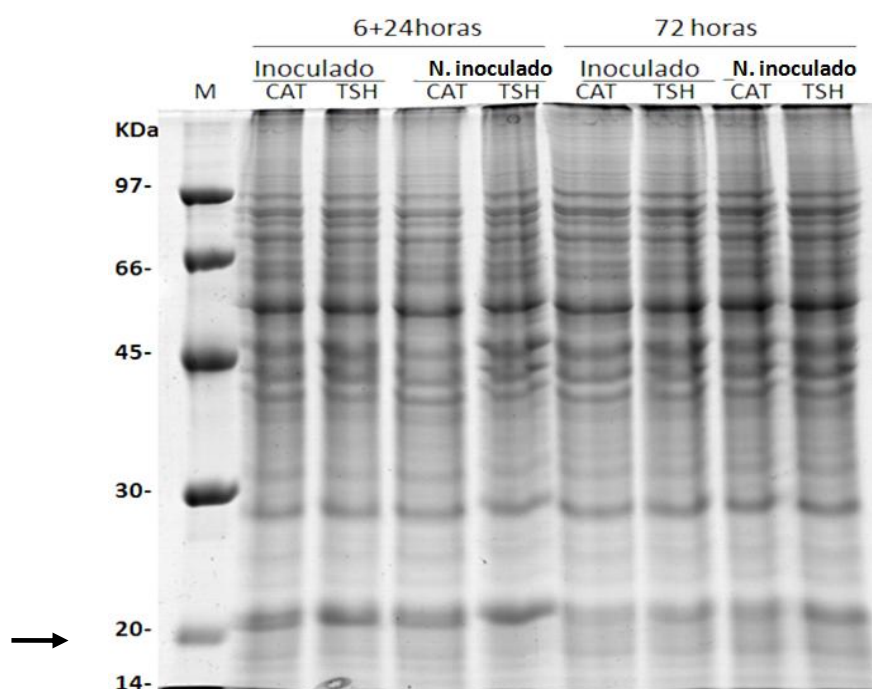


**Figura 3.** Agrupamento das amostras a partir da dispersão dos pontos de coletas quanto às massas de proteínas extraídas. Numeração de 1 a 4 referente ao “ponto” ou período de coleta, C= Catongo, T= TSH 1188, n= não inoculado, i= Inoculado.

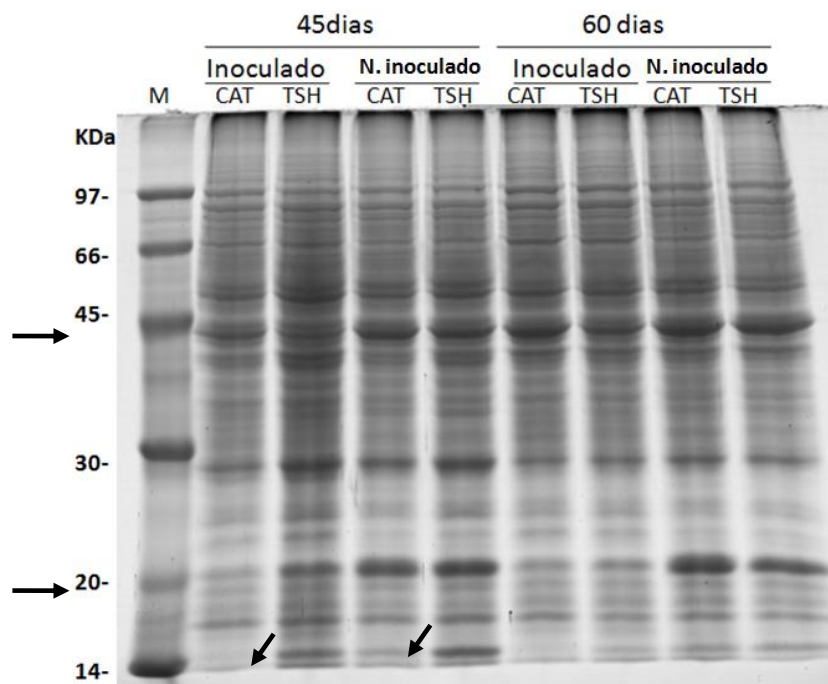
#### 4.2. Perfil proteico de ápices caulinares não inoculados e inoculados com *Moniliophthora perniciosa*

Os perfis obtidos em SDS-PAGE mostraram bandas bem resolvidas, com boa separação, não apresentando arrasto que prejudiquem a observação das mesmas em gel (Figura 4). Em geral o acúmulo de proteínas ocorreu em praticamente todas as regiões do gel e principalmente entre 45 e 97 kDa, mas foi observado o acúmulo diferencial de proteínas correspondentes a região próxima a 20 kDa (indicado por seta), sendo claramente observado que os tratamentos com 72 horas apresentaram menor nível de acúmulo destas proteínas quando comparados aos tratamentos de 6+24 horas. A partir da análise do gel da Figura 5, onde são visualizados os tratamentos de 45 e 60 dias, observa-se que, assim como na Figura 4, o acúmulo de proteínas ocorrem em todas as regiões do gel de uma forma geral. É possível observar a diferença no nível de acúmulo de proteínas entre os tratamentos, principalmente nas regiões de 40 e 20 kDa (indicado por seta), onde os tratamentos apresentam claramente uma diminuição do acúmulo de proteínas quando comparados os tratamentos não inoculados com os inoculados. Esse efeito é observado mais claramente nos tratamentos não inoculados

do ponto 4 (60 dias). Outra observação pertinente é a presença de bandas únicas que ocorrem em tratamentos específicos, como observado nas regiões próximas a 14 kDa onde os tratamentos inoculados de Catongo não apresentam uma “banda” que ocorre nos tratamentos não inoculados (indicados por seta) de mesmo genótipo e em todos os outros tratamentos do genótipo TSH 1188. De forma geral observa-se que algumas “bandas” de proteínas situadas nas regiões entre 90 e 60 kDa apresentam um acúmulo maior nos tratamentos inoculados quando comparadas aos não inoculados.



**Figura 4.** Perfil proteico em gel SDS-PAGE obtido a partir do extrato total de ápices caulinares de cacau. Na coluna M, marcador molecular, as demais colunas apresentam os genótipos Catongo (CAT) e TSH 1188 (TSH) inoculados e não inoculados nos tempos 6+24 horas e 72 horas. Gel feito com 20 $\mu$ g de amostra.

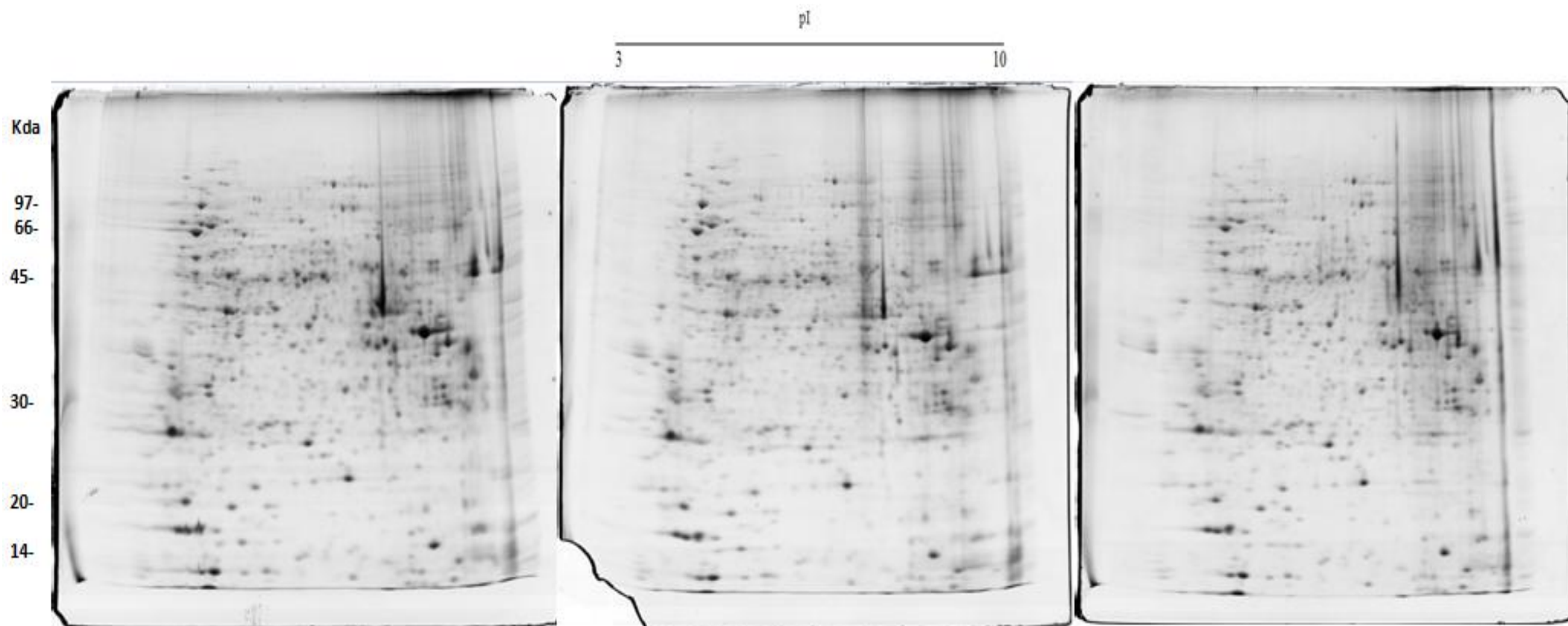


**Figura 5.** Perfil proteico em gel SDS-PAGE obtido a partir do extrato proteico total de ápices caulinares de cacau. Na coluna M, marcador molecular, as demais colunas apresentam os genótipos Catongo (CAT) e TSH 1188 (TSH) inoculados e não inoculados nos tempos 45 e 60 dias. Gel feito com 20 µg de amostra.

Somente os tratamentos referentes aos pontos 2 e 3 (72 horas e 45 dias respectivamente) foram utilizados para as análises proteômicas seguintes. Foram feitos um total de 24 géis, compreendendo oito tratamentos sendo uma triplicata por tratamento, os mesmos são discriminados a seguir: dois genótipos (TSH 1188 e Catongo), dois pontos de coletas (72 horas e 45 Dias), em duas condições (inoculados e não inoculados) e três repetições experimentais.

Como observado na Figura 6, as três replicatas dos géis bidimensionais apresentaram boa reprodutibilidade visto que é possível observar grande identidade entre os *spots* com ocorrência simultânea nos três géis. Além disso, os *spots* foram bem resolvidos sem presença de grandes arrastes ou manchas proveniente de compostos interferentes que dificultam a análise dos géis, indicando a eficiência do protocolo de extração proteica utilizado.





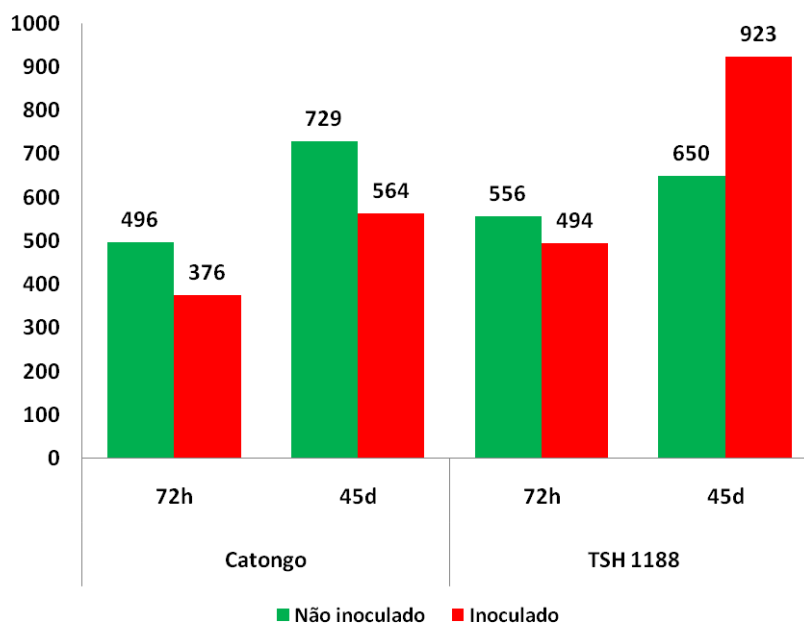
**Figura 6.** Géis bidimensionais (triplicata), destacando o genótipo TSH 1188 em 45 DAI dias infectado pelo fungo *M. perniciosa*, em condição de casa de vegetação. Uma massa de 500 µg de proteínas totais foi carregada no gel. À esquerda o marcador de peso molecular, na região superior marcador de ponto isoelétrico 3 -10 não linear.

O “*match*” realizado pelo programa Image Master 2D Platinum (GE Healthcare) que indica, dentre outras coisas, a identidade de *spots* comuns dentro da triplicata, apresentou valores ótimos de reprodutibilidade como pode ser observado na Tabela 4. Em média as triplicatas tiveram 83,9% de reprodutibilidade, indicando que as mesmas foram realizadas de forma controlada e não apresentaram grandes variações. A detecção do número de *spots* por tratamento também pode ser observada na Figura 7, onde verifica-se que em 72 horas ambos os genótipos apresentam um perfil similar quanto a ocorrência de *spots*, pois ambos apresentaram mais *spots* no tratamento não inoculado e uma menor quantidade no tratamento inoculado, essa característica é mais acentuada para o genótipo Catongo. Em 45 dias observamos que ocorre uma inversão do padrão acima descrito, porém apenas para o genótipo TSH 1188, onde nota-se um número maior de *spots* no tratamento inoculado.

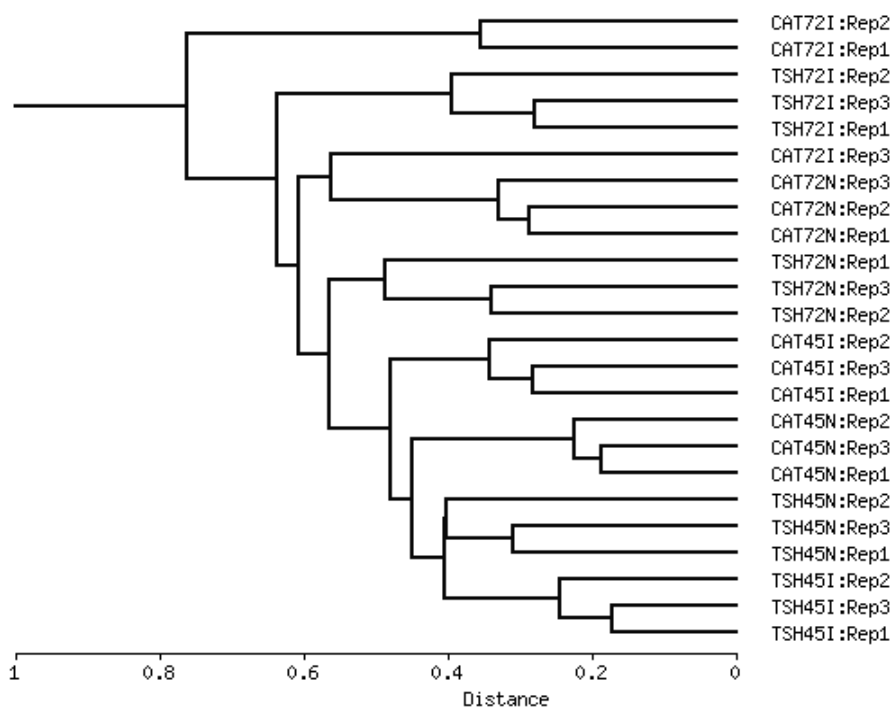
A qualidade da extração e a reprodutibilidade dos géis são características importantes para a padronização dos experimentos e requeridas principalmente para as análises estatísticas subsequentes. Para tanto, utilizando a ferramenta *online NIA array analysis tool*, obteve-se o agrupamento das réplicas através do nível de similaridade entre os valores dos *spots* (gerados anteriormente pelo Image Master 2D Platinum) (Figura 8). A análise do agrupamento mostrou que 23 das 24 réplicas analisadas, agruparam corretamente dentro dos tratamentos em questão, mostrando o alto grau de similaridade dentro das triplicatas.

**Tabela 4.** Reprodutibilidade por “*match*” entre triplicatas de geis 2D, para os pontos de coleta referentes a 72 horas e 45 dias dos genótipos Catongo (suscetível) e TSH 1188 (resistente).

Tratamento	Deteção	<i>Match</i> na triplicata	Reprodutibilidade (%)
Catongo 72H NI	569	496	87.17
Catongo 72 HAI	448	376	83.92
TSH 1188 72h NI	702	556	79.2
TSH 1188 72 HAI	543	494	90.97
Catongo 45D NI	828	729	88.04
Catongo DAI	688	564	81.97
TSH 1188 45D NI	724	650	89.77
TSH 1188 DAI	978	923	94.37



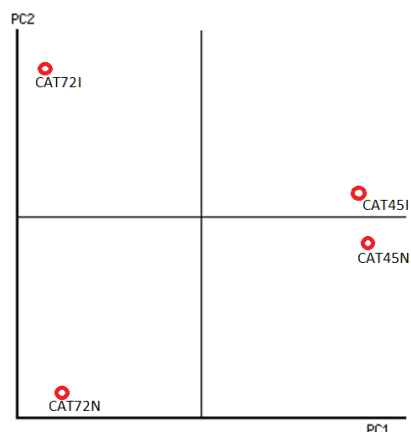
**Figura 7.** Número total de *spots* presentes na triplicata detectados por *match* a partir da análise de géis bidimensionais para os genótipos Catongo e TSH 1188, tanto nas condições inoculado e não inoculado pelo fungo *M. pernicioso*, em 72 horas e 45 dias. Condição de casa de vegetação.



**Figura 8.** Agrupamento das replicas experimentais gerada pela ferramenta *online NIA array analysis tool*.

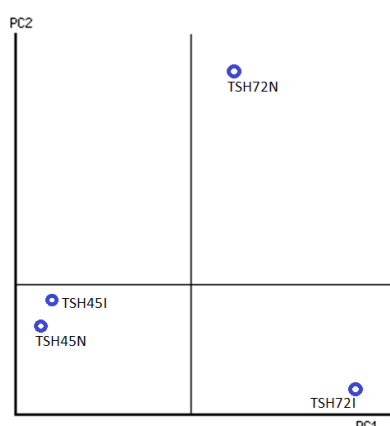
O agrupamento global dos *spots* identificados por *match* entre as triplicatas dos diferentes tratamentos foram visualizados na análise de componentes principais (PCA) para

identificar de forma global o agrupamento das amostras quanto aos diferentes tratamentos. A PCA foi feita para os genótipos individualmente e em conjunto (Figura 9). Foi possível agrupar amostras semelhantes e caracterizar aquelas com perfis diferentes. A figura 9A apresenta o *biplot* para o genótipo Catongo onde o componente 1 explica 63,94% da variação total e o componente 2 explica 20,56%. A Figura 9B apresenta o *biplot* para o genótipo TSH 1188 onde o componente 1 explica 50,433% da variação e o componente 2 30,35%. A Figura 9C apresenta o *biplot* em conjunto de ambos os genótipos. O componente 1 explica 30,01% da variação e o componente 2, apenas 16,184%.



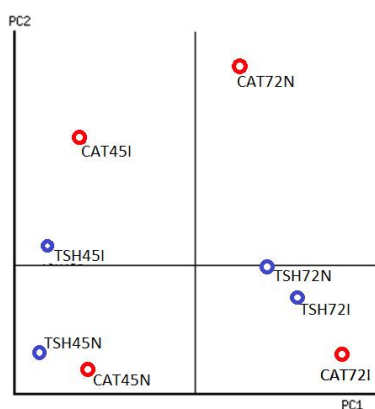
A

PC#	Value	Percent	Cumulative percent
1	2.55766	63.941	63.941
2	0.82266	20.566	84.507
3	0.61967	15.491	99.998
4	0.00000	0	99.998



B

PC#	Value	Percent	Cumulative percent
1	2.01733	50.433	50.433
2	1.21412	30.353	80.786
3	0.76855	19.213	99.999
4	-0.00000	0	99.999



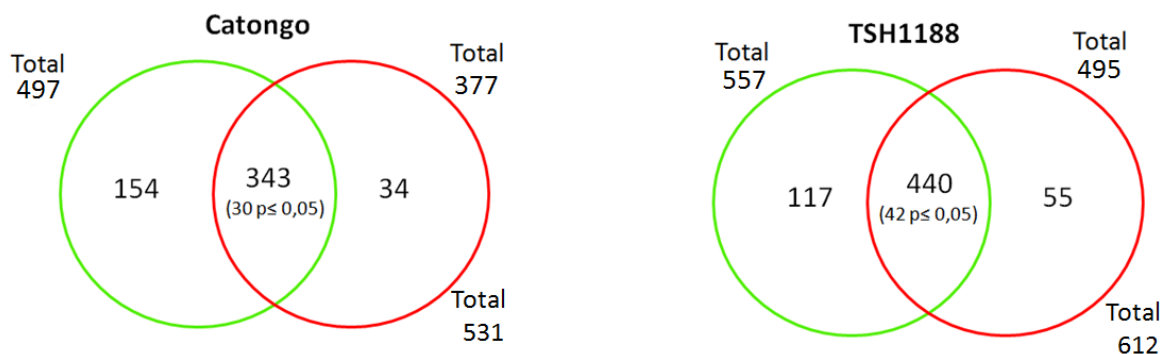
C

PC#	Value	Percent	Cumulative percent
1	2.40086	30.01	30.01
2	1.29479	16.184	46.194
3	1.14309	14.288	60.482
4	1.02397	12.799	73.281
5	0.86532	10.816	84.097
6	0.80051	10.006	94.103
7	0.47146	5.893	99.996
8	0.00000	0	99.996

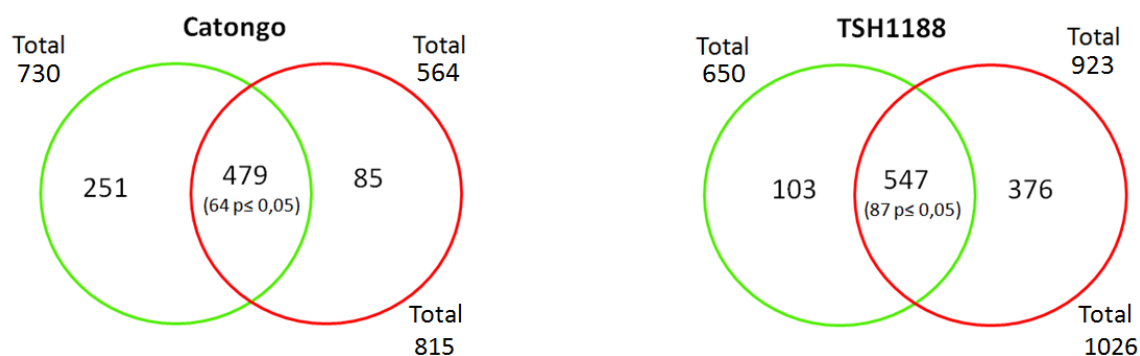
**Figura 9.** Em A *biplot* para todos os tratamentos do genótipo Catongo. B, *biplot* para todos os tratamentos do genótipo TSH 1188. C, *biplot* para todos os tratamentos dos dois genótipos analisados em conjunto. A esquerda dos *biplots* valores das PCA's. Pontos em azul indicam o genótipo resistente, em vermelho indicam o genótipo suscetível. cada ponto representa uma triplicata, nomeada da seguinte forma: Letras iniciais da sequência representando os genótipos, seguido pelos números representado o período do tratamento, **72** horas e **45** dias e as letras finais representando a condição inoculado **I** e não inoculado **N**.

A análise do número de *spots* obtidos nos perfis proteicos dos tratamentos inoculados e não inoculados em ambos os genótipos foi organizada no diagrama de Venn (Figura 10), onde verifica-se a ocorrência geral dos *spots* para todos os tempos analisados. As comparações foram feitas apenas dentro dos genótipos, onde o tratamento inoculado e não inoculado de um mesmo tempo foram comparado por *match*. Observamos que em 72 HAI para o genótipo suscetível Catongo, 343 *spots* foram comuns aos tratamentos, destes, 30 apresentaram expressão diferencial com  $p \leq 0,05$ . Trinta e quatro foram exclusivos ao tratamento inoculado e 154 exclusivos ao não inoculado. Para o genótipo resistente TSH 1188, 440 *spots* foram comuns aos tratamentos inoculado e não inoculado dos quais 42 apresentaram expressão significativa ( $p \leq 0,05$ ). Cinquenta e cinco *spots* foram exclusivos ao tratamento inoculado e 117 ao tratamento não inoculado. Em 45 DAI para o genótipo Catongo 479 *spots* foram comuns aos tratamentos inoculado e não inoculado, dos quais 64 apresentaram expressão ( $p \leq 0,05$ ). Oitenta e cinco *spots* foram exclusivo são tratamento inoculado e 251 ao tratamento não inoculado. Já o TSH 1188 temos apresentou 547 *spots* comuns dos quais 87 foram significativos ( $p \leq 0,05$ ). Trezentos e setenta e seis foram exclusivos ao tratamento inoculado e 103 ao tratamento não inoculado.

# A



# B



**Figura 10.** Número de *spots* detectados em géis bidimensionais discriminados quanto a ocorrência. Diagrama de Venn a partir da análise dos géis através do programa Image Master 2D Platinum 7.0 (GeHealthCare). Diagramas para os genótipos suscetível e resistente em 72 horas (A) e 45 dias (B). Círculos cinzas representam os tratamentos não inoculados, círculos pretos representam tratamentos inoculados.

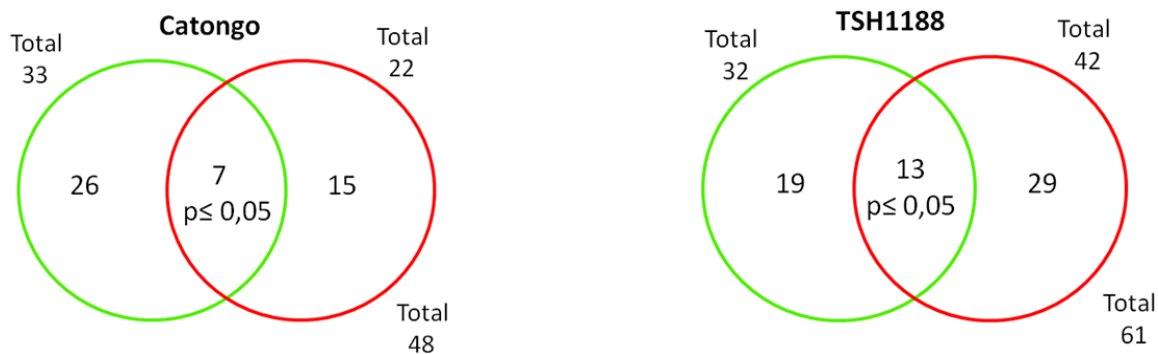
### 4.3. Identificações de *spots* proteicos diferencialmente expressos

Os *Spots* proteicos estatisticamente significantivos são aqui considerados tanto os comuns diferencialmente expressos com  $p \leq 0,05$  e variação de intensidade (razão)  $\geq 1,5$ , quanto os exclusivos do tratamento inoculado e não inoculado. Um total de 582 *spots* proteicos foram identificados, gerando duas listas de proteínas, uma para cada genótipo (Tabela 5A e 5B), sendo que para o genótipo Catongo em 72 HAI foram identificados 7 *spots*

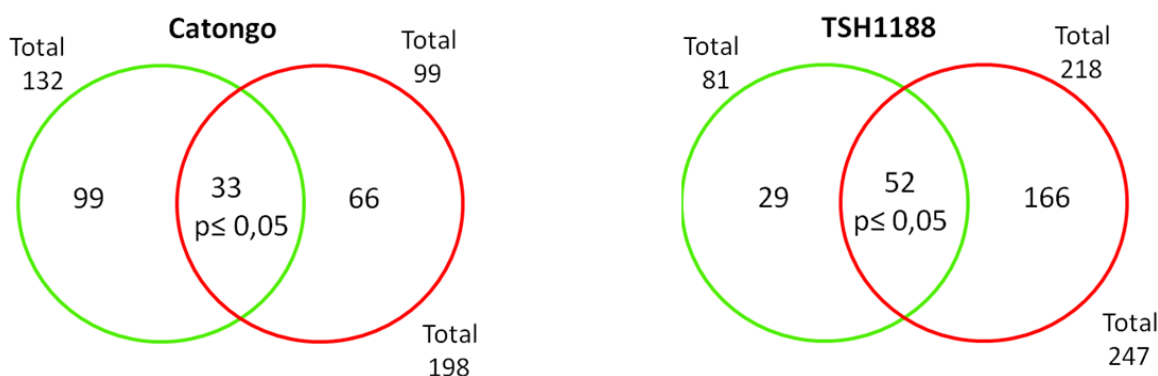
comuns com  $p \leq 0,05$ , quinze exclusivos do tratamento inoculado e 26 exclusivos do tratamento não inoculado.

Aos 45 DAI foram identificados 33 *spots* comuns com  $p \leq 0,05$ . Sessenta e seis exclusivos do tratamento inoculado e 99 exclusivos do tratamento não inoculado. Para TSH 1188 em 72 HAI, 13 *spots* comuns com  $p \leq 0,05$  foram identificados. Quanto aos com ocorrência exclusiva, 29 e 19 *spots* foram identificados para os tratamentos inoculado e não inoculado respectivamente. Em 45 DAI, 52 *spots* comuns com  $p \leq 0,05$  foram identificados. Cento e sessenta e seis exclusivos do tratamento inoculado e 29 exclusivos do tratamento não inoculado. Os *spots* identificados também foram organizados em Diagramas de Venn como observado na Figura 11.

**A**



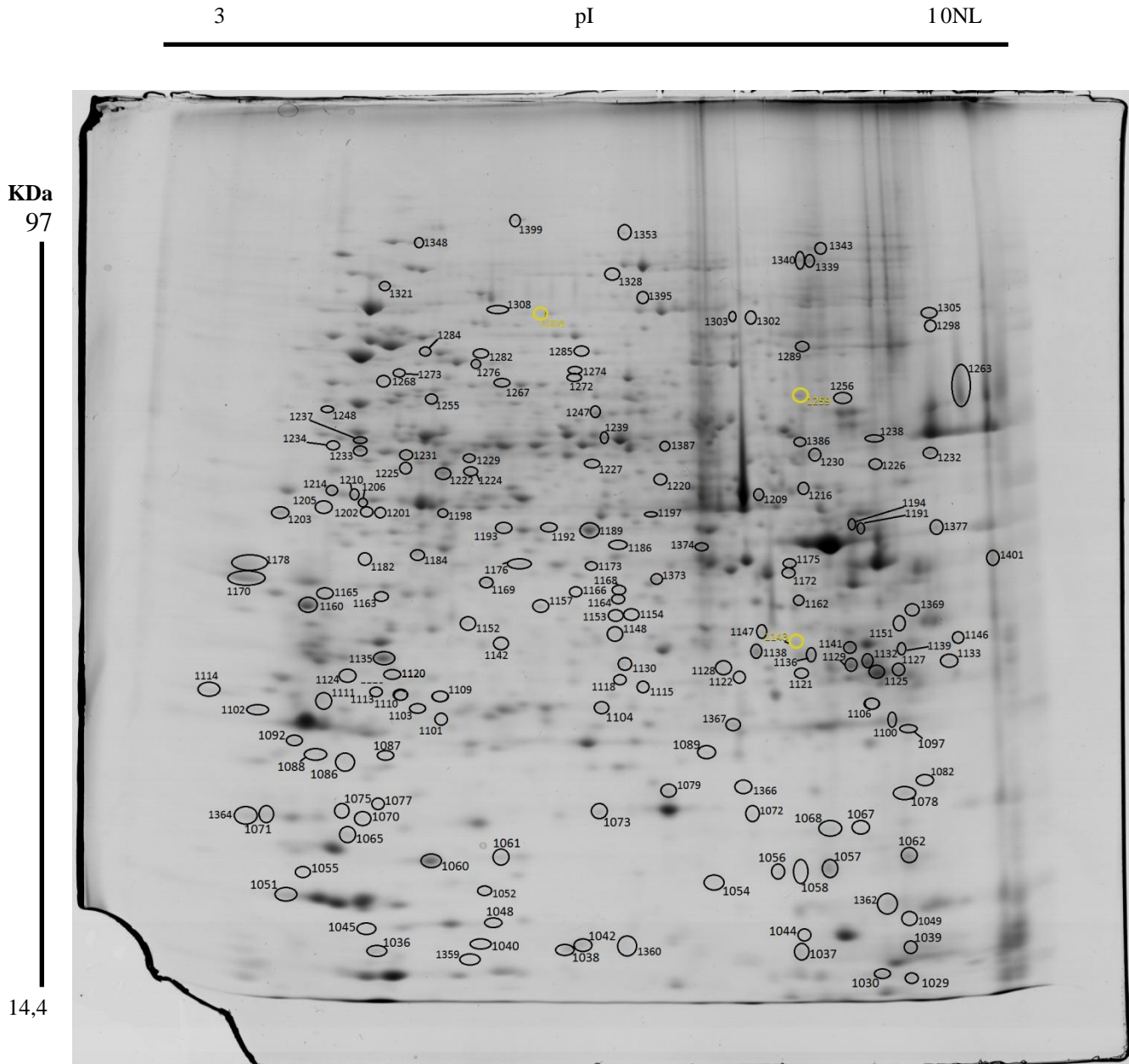
**B**



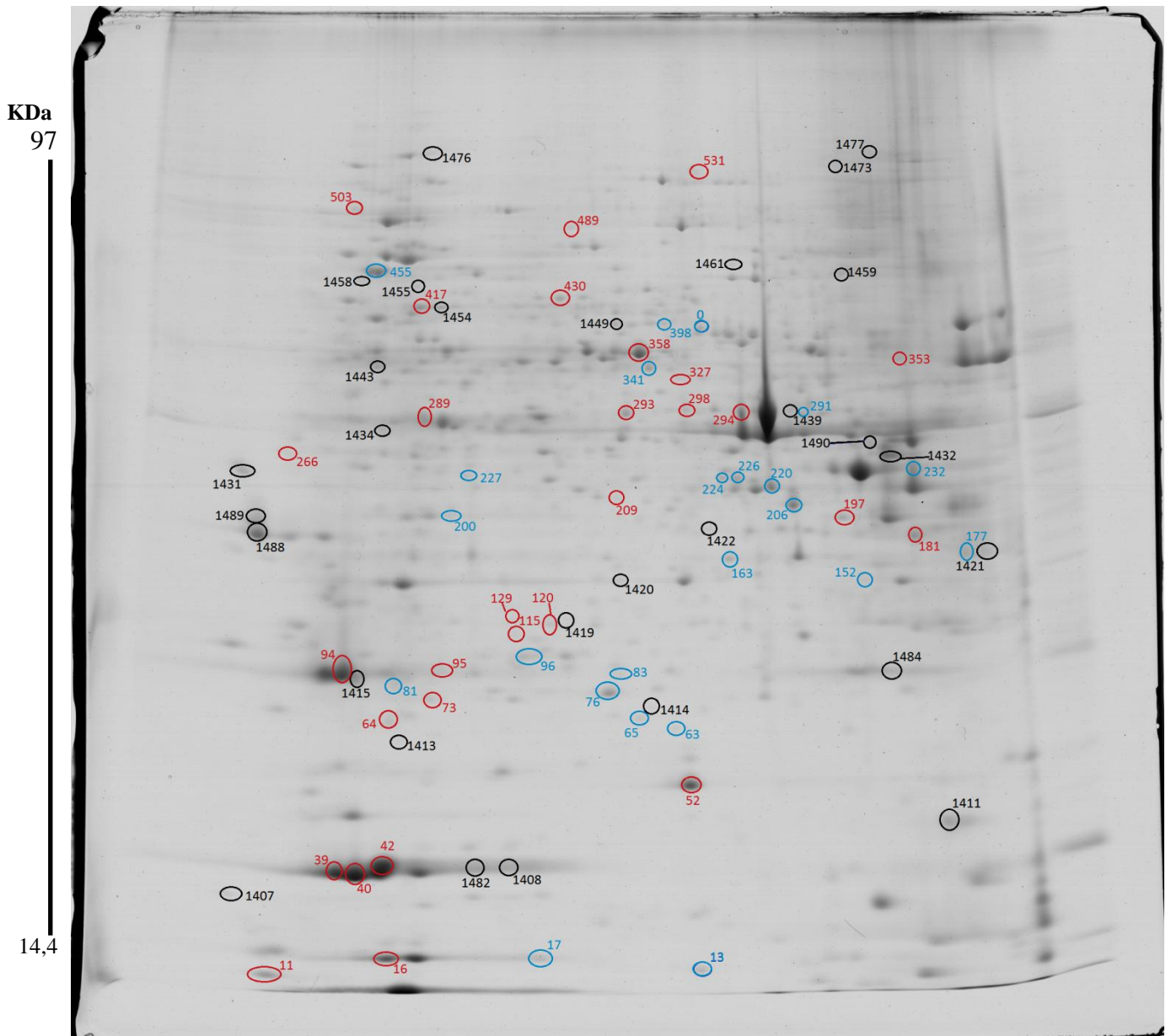
**Figura 11.** Diagramas de Venn realizados a partir do número de *spots* identificados em géis bidimensionais discriminados quanto a ocorrência. Diagramas para os genótipos Catongo e TSH 1188 em 72 horas (A) e 45 dias (B). Círculos cinzas representam os tratamentos não inoculados, círculos pretos representam tratamentos inoculados.



A análise dos *spots* gerou um mapa de referência dos *spots* identificados. Para exemplificar, as Figuras 12 e 13 mostram o mapeamento referente ao genótipo TSH 1188 das proteínas exclusivas tanto do tratamento inoculado e não inoculado como, também das proteínas comuns com acúmulo diferencial ( $p \leq 0,05$ ) e variação de intensidade (razão)  $\geq 1,5$  para mais ou para menos. Os demais mapas proteicos podem ser visualizados no Arenexo 2.



**Figura 12.** Mapa proteico referente às localizações das proteínas identificadas para o genótipo TSH 1188 infectado com fungo *M. perniciosa*. Círculos em preto representam os *spots* identificados exclusivamente para este tratamento. Os círculos amarelos apresentam *spots* onde foram identificadas proteínas fúngicas.



**Figura 13.** Mapa proteico referente às localizações das proteínas identificadas para o genótipo TSH 1188 em 45 dias na condição não inoculada. Círculos em preto representam os *spots* onde foram identificadas proteínas exclusivas do tratamento não inoculado. Os círculos azuis (UP) e vermelhos (DOWN) representam as proteínas de ocorrência comum entre os tratamentos inoculado e não inoculado que apresentaram expressão diferencial ( $p \leq 0,05$ ) e variação de intensidade (razão)  $\geq 1,5$ .

#### 4.4. Classificação funcional e localização subcelular das proteínas identificadas

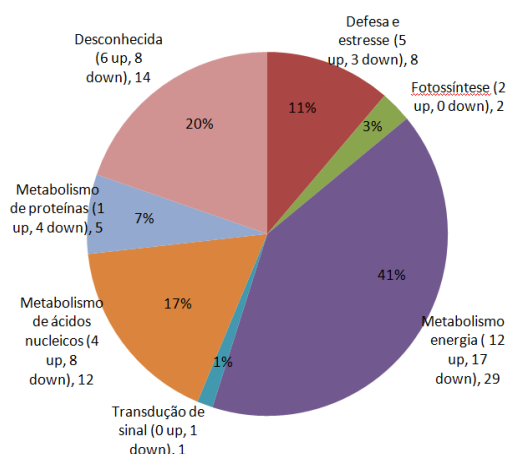
As proteínas identificadas foram agrupadas de acordo a sua função biológica no banco de dados *The Gene Ontology* através da ferramenta Blast2Go. Oito grupos funcionais foram criados sendo eles: O - estresse oxidativo; F – fotossíntese ; E – metabolismo e energia; T – transdução de sinal; N – metabolismo de nucleotídeos e ácidos nucléicos; P – metabolismo de proteínas e U – desconhecidas.

Neste trabalho consideramos que as proteínas exclusivas dos tratamentos não inoculados e inoculados seriam inclusas como *down* e *up* acumuladas respectivamente dentro das análises. A maioria das proteínas identificadas em resposta à inoculação tanto para o genótipo Catongo quanto para o TSH 1188 em 72 HAI e 45 DAI, estavam associadas a metabolismo e energia, 41% e 38% respectivamente (Figura 14 e 15). Para TSH 1188 em 72 HAI observamos um grande quantidade de proteínas associadas à defesa e estresse (16%). Verificou-se ainda uma grande quantidade de proteínas com função desconhecida para Catongo em 72 HAI (20%). Em 45 DAI ambos os genótipos tiveram um aumento no grupo de proteínas associadas à defesa e estresse.

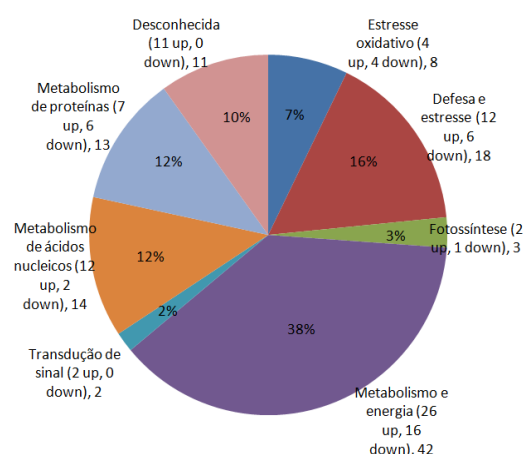
É interessante observar que em geral o genótipo TSH 1188 (resistente) apresentou uma *up* acumulação de proteínas em resposta a infecção quando comparado ao genótipo Catongo (suscetível) que apresentou mais grupos funcionais com proteínas representativas *down* acumuladas (Figura 14 C, D e Figura 15 C, D). A diferença observada evidencia a singularidade das respostas metabólicas que provavelmente estão associadas à resistência e suscetibilidade que caracterizam esses genótipos.

As proteínas identificadas também foram agrupadas quanto à localização celular através da ferramenta Blast2Go. Oito grupos foram criados, sendo eles: P – cloroplasto; M – mitocôndria; C – citoplasma; L – membrana celular; N – núcleo; A – apoplasto; U – desconhecida (Figura 14 E, F e 15 E, F). Em 72 HAI nota-se que em Catongo existe um grande número de proteínas com localização desconhecida, seguida de proteínas associadas ao cloroplasto e citoplasma. Em TSH 1188, em 72 horas, 22% das proteínas estavam associadas ao cloroplasto, seguida de proteínas com localização desconhecida (15%) e associadas ao citoplasma (14%). Para ambos os genótipos em 45 DAI observamos que a maioria das proteínas identificadas estavam associadas ao cloroplasto, membrana plasmática e citoplasma.

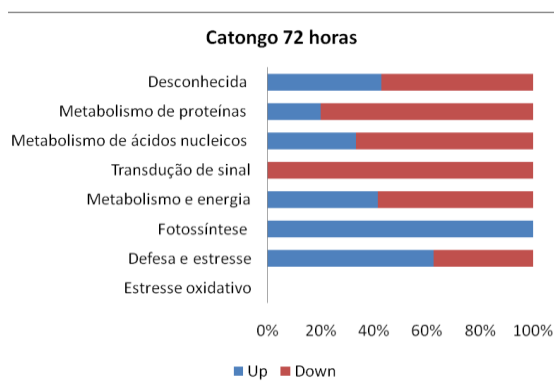
A



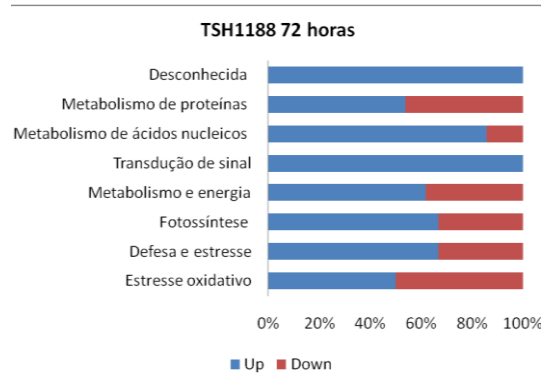
B



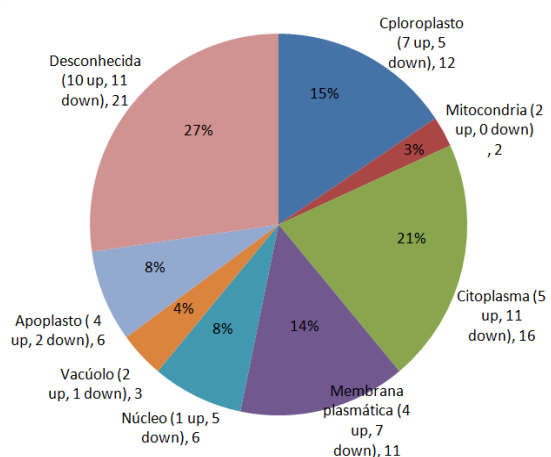
C



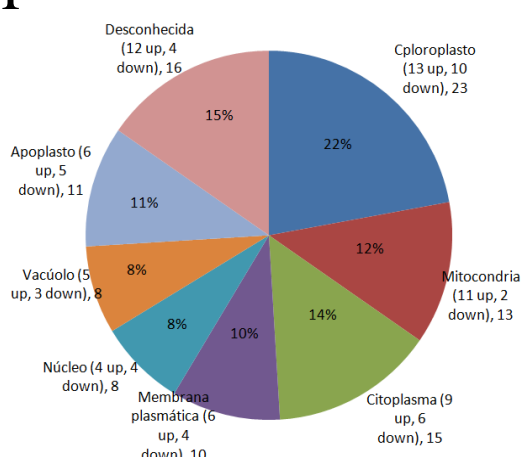
D



E

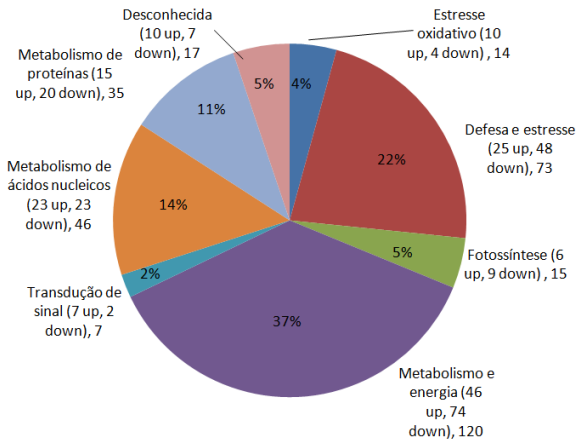


F

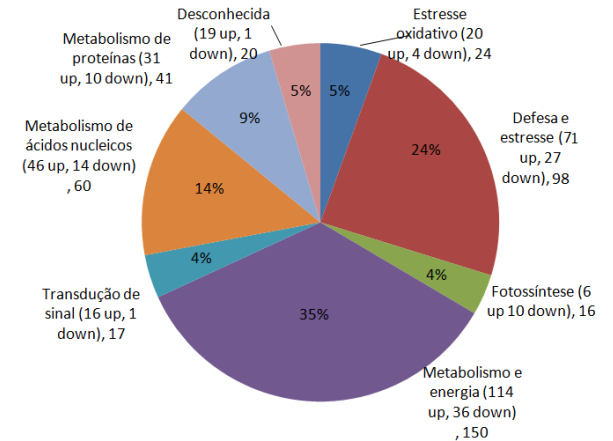


**Figura 14.** Categorização funcional e localização subcelular das proteínas identificadas. Análises realizadas no software Blast2Go referentes 72 horas de tratamento. Categorização funcional para o genótipo Catongo (A) e para o genótipo TSH 1188 (B). Contribuição para a categorização funcional das proteínas Up (azul) e Down (vermelho) acumuladas para o genótipo Catongo (C) e para o genótipo TSH 1188 (D). Localização subcelular para o genótipo Catongo (E) e para o genótipo TSH 1188 (F).

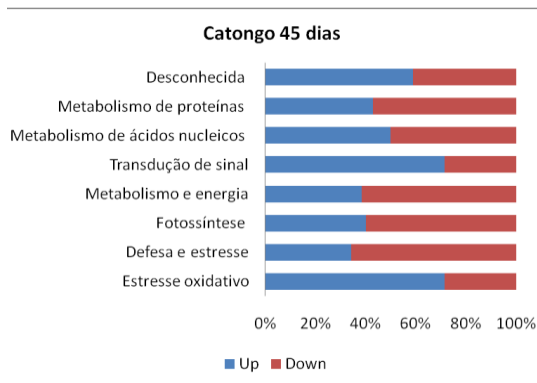
A



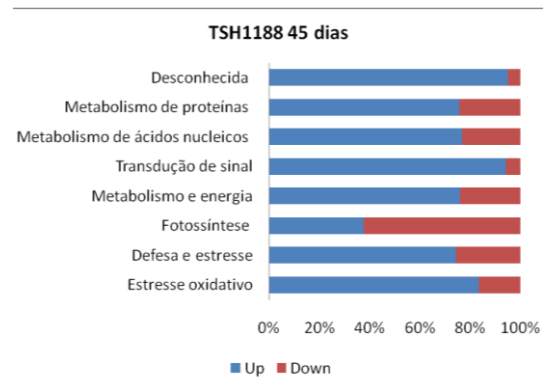
B



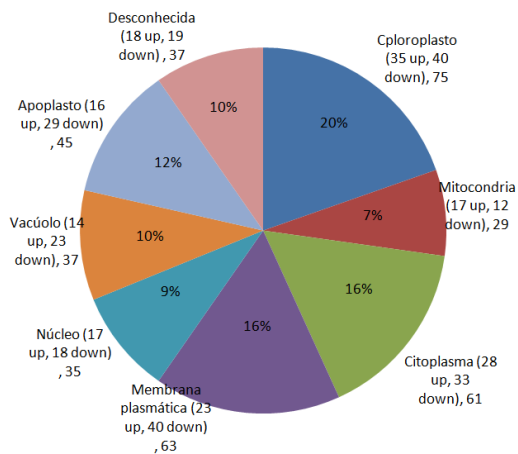
C



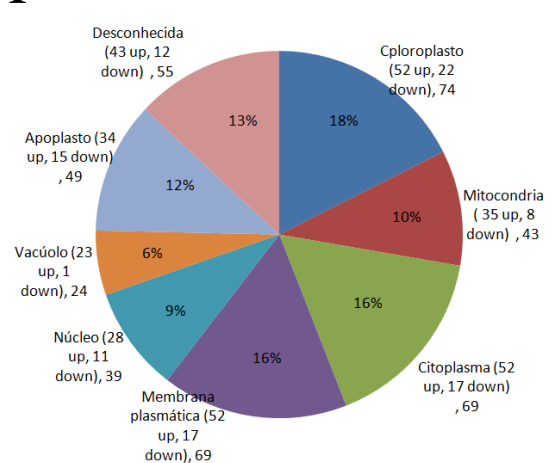
D



E



F



**Figura 15.** Categorização funcional e localização subcelular das proteínas identificadas. Análises realizadas no *software* Blast2Go referentes a 45 dias de tratamento. Categorização funcional para o genótipo Catongo (A) e para o genótipo TSH 1188 (B). Contribuição para a categorização funcional das proteínas Up (azul) e Down (vermelho) acumuladas para o genótipo Catongo (C) e para o genótipo TSH 1188 (D). Localização subcelular para o genótipo Catongo (E) e para o genótipo TSH 1188 (F).

## 4.5. Proteínas identificadas

### 4.5.1. Estresse oxidativo

Os nossos resultados mostraram que em 72 HAI o genótipo resistente apresentou a expressão diferencial de 8 proteínas associadas a estresse oxidativo. Quatro *spots* apresentaram proteínas up acumuladas dentre eles destacam-se a Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase C2 isoforma 1 no *spot* 1123 e isoforma 2 *spot* 1122.

Quatro proteínas foram down acumuladas, sendo uma peroxidase 4 (*spot* 1005), chaperonin cpn60- mitochondrial-like (*spot* 1033), 2-cisteína peroxiredoxina B (*spot* 1052), peroxidase classe 3 (*spot* 1006). Peroxidases são proteínas que podem ser citoplasmáticas, mitocondriais, cloroplastídicas e peroxissomais bem como podem ser secretadas (CAMILLO *et al.*, 2013). São codificadas por uma família multigênica e participam de funções celulares importantes, como, biossíntese de ligninas, suberização, metabolismo de auxinas, estresse biótico e abiótico e tem como função principal a detoxificação celular do excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (TOGNOLLI *et al.*, 2002; COSIO e DUNAND, 2008).

Catongo em 72 HAI não foram identificadas proteínas dentro desse grupo funcional, no entanto não podemos afirmar definitivamente que essas proteínas não estão sendo produzidas, mesmo sendo esse genótipo suscetível, pois elas podem estar dentro do grupo de proteínas que não variaram em 72 HAI. Além disso, devido ao fato de que a quantidade de identificações em 72 horas foram menores em relação à detecção, do que em 45 dias como observado no diagrama de Venn (Figura 10) e ainda as identificações são limitadas por problemas inerentes a própria técnica influenciando diretamente a quantidade das mesmas.

Ao contrário do que foi verificado em 72 horas, observou-se um número considerável de peroxidases up acumuladas no genótipo suscetível (*spots* 622, 813, 1544, 1531) e resistente (*spots* 1421, 1432, 1490, 1141, 1132, 1129, 1401, 177 (*fold change* +3.58), 1224, 1222, 1068) incluindo ascorbato peroxidases (*spots* 96 *fold change* +1.6 e 1104). Genes para ascorbato peroxidases desempenham papel importante na produção de ROS e morte celular programada (PCD) por participarem dos processos de degradação de oxalato de cálcio (CEITA *et al.*, 2007). Foi observada também a ocorrência de isoformas de peroxidases, sendo down

acumuladas em ambos os genótipos: TSH 1188 (*spots* 1490, 1432 e 1421) e Catongo (*spots* 1639 1637 e 1657).

#### 4.5.2. Metabolismo de carboidratos e fotossíntese

Neste trabalho observamos que o genótipo resistente, quando comparado ao suscetível em 72 HAI, apresentou maior quantidade de proteínas diferencialmente expressas associadas ao metabolismo de açúcares. Dentre elas destacamos a *up* acumulação de duas isoformas de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*spots* 1123 e 1122), que catalisam a conversão do gliceraldeído-3-fosfato em D-glicerato 1,3-bisfosfato (sexta etapa da via glicolítica). Uma glicosil-hidrolase (*spot* 1106), que catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas. Uma Beta xilosidase alfa L arabinofuranosidase 2 putativa (*spot* 1120), que é uma exoenzima bifuncional associada a liberação de xilose e arabinose da parede celular (XIONG *et al.*, 2007), e uma proteína não caracterizada onde análise por blast indicou similaridade com uma proteína da superfamília NagB/RpiA/CoA transferase-like (*spot* 1138), conhecida por possuir proteínas com diferentes funções, incluindo, isomerase de carboidrato, fatores de translocação e acetil-CoA transferase (ANANTHARAMAN e ARAVIND, 2006).

Dentre as proteínas *down* acumuladas encontramos apenas uma proteína da família Lactato/malato desidrogenase (*spot* 1009), proteínas dessa família podem tanto participar do ciclo de Krebs catalisando a conversão do malato em oxaloacetato numa reação reversível, bem como na glicólise catalisando a conversão de piruvato em lactato.

O genótipo suscetível em 72 HAI assim como no genótipo resistente, apresentou maior *up* acumulação de proteínas do que *down*, associadas ao metabolismo de açúcares. Dentre elas uma malato desidrogenase (*spot* 231 *fold change* + 3.35) uma isoforma de sucrose sintase (*spot* 273 *fold change* +2.14), uma pirofosfato-dependente 6-fosfofrutoquinase (*spot* 212 *fold change* +1.57). Essa proteína catalisa a fosforilação da frutose 6-fosfato em frutose-1, 6-bisfosfato, usando um pirofosfato inorgânico (RESHETNIKOV *et al.*, 2008). Uma proteína associada à síntese de desoxicarboidrato ramnose também foi encontrada (*spot* 946).

Quanto a proteínas *down* acumuladas, destaca-se uma beta-glucosidase 44 (*spot* 916) que libera beta-D-glicose a partir da hidrólise de resíduos terminais de beta-D-glicosil, uma

malato desidrogenase (*spot* 885) e uma riboquinase *PfkB-like carbohydrate kinase* (*spot* 808) que é uma proteína associada a fosforilação de carboidratos, participando do metabolismo de D-ribose. Essa proteína foi encontrada apenas no genótipo suscetível e down acumulada em ambos os tempos.

Em 45 dias observou-se a *up* acumulação mais acentuada de proteínas associadas a metabolismo de carboidratos para o genótipo resistente, Foram um total de 16 spots proteicos *up* acumulados e cinco *down* acumulados. Diferente dos resultados encontrados para o genótipo suscetível, onde verificou-se 14 spots *down* acumulados e 8 *up* acumulados, indicando que nesse período o genótipo suscetível tem seu metabolismo aparentemente mais reduzido.

Dentre as proteínas *up* acumuladas no genótipo resistente destacam-se uma isoforma de proteína da família das aldolases (*spot* 206 fold change +1.8), que participa da conversão de glucose em energia, um gliceraldeído-3-fosfato, assim como observado em 72 HAI (*spot* 232 fold change +3.85), duas glicosil hidrolases (*spots* 1138 e 1302), fosfoglicerato quinase (*spot* 1039) que participa da gliconeogênese e biossíntese de amido. Também foram encontradas proteínas associadas a vias e metabolismo de pentoses como Sedoheptulose-bisfosfatase (*spot* 1038) 6-phosphogluconato desidrogenase (*spot* 1128), Insulinase (Peptidase família M16) (*spot* 398 fold change +1.5).

Dentre as *down* reguladas destacam-se uma proteína que por *blast* mostrou similaridade com uma aldolase (*spot* 1488), uma isoforma de uma proteína da família das amidases associadas ao metabolismo de amido (*spot* 353 fold change – 3.97) e uma enzima fosfomannutase (*spot* 1420) associada à biossíntese da hexose manose.

Para o genótipo suscetível em 45 DAI destacamos *down* regulação de grande parte das proteínas dentre elas: malato desidrogenase (*spot*1649), enolase (*spot* 1685), uma enzima da via glicolítica que catalisa a conversão de 2-fosfoglicerato para fosfoenolpiruvato. Dois *spots* (943 e 1716) identificados como enzimas málicas dependente de NADP que além de estarem associadas ao metabolismo de açúcares, também participam na resposta de resistência a estresse abiótico na aclimatação de *Nicotiana tabacum* L. à seca. (HÝSKOVÁ *et al.*, 2014). Uma riboquinase (*spot* 1641), dois *spots* identificados como adolases spots (1794 e 1648), uma isoforma de fosfoglicerato quinase no *spot* 1678. A *up* regulação para esse genótipo foi verificadas em poucas proteínas, dentre elas duas isoformas de aldolase (*spot* 1569 e 787 fold change + 1.6) e uma glicose-6-fosfato desidrogenase (*spot* 868 fold change +1.5).



Em 72 HAI encontramos proteínas relacionadas a fotossíntese tanto em TSH 1188 (spots 1100 1114 contendo Ribulose bisfosfato carboxilase/oxigenase ativase 1 isoforma 1) como em Catongo (*spot* 967, uma proteína hipotética identificada por *blast* como proteína cloroplástica de evolução do oxigênio (OEE1) que pertence ao complexo de evolução do oxigênio no fotossistema II). Ribulose bisfosfato carboxilase/oxigenase ativase tem por função a ativação da Rubisco que por sua vez esta associada ao metabolismo fotossintético e fotorespiratório. Essa proteína foi encontrada por Jones *et al.*, (2006) no proteoma de *Arabidopsis* respondendo diferencialmente ao estresse por *Pseudomonas syringae*. Asgharie Ebrahimzadeh (2006) verificaram que a Ribulose ativase também se acumula em *Triticum aestivum* em resposta a estresse abiótico. Esses resultados podem indicar um esforço metabólico no sentido de continuar a fixação de CO<sub>2</sub> bem como a capacidade fotossintética da planta em reposta a presença do *M. pernicioso*.

Em 45 DAI houve uma maior *down* acumulação para as proteínas relacionadas a fotossíntese, dentre elas, proteínas do complexo de antenas em TSH 1188 (*spot* 64 *fold change* -2, *spot* 73 *fold change* -1.76 e *spot* 94, *fold change* -2.29) que estão associadas intimamente às clorofilas e participam da captura de fótons. Subunidade D-2 do fotossistema 1 também foi *down* acumulada (*spot* 1411). E em Catongo uma série de proteínas associadas ao fotossistema I e II foram *down* acumuladas (*spots* 1626, 1595, 1626 e 1595).

#### 4.5.3. Defesa e estresse

Assim como verificado anteriormente, observamos mais uma vez que o genótipo resistente apresenta uma *up* acumulação de proteínas maior que o genótipo suscetível. Dessa forma observamos que em 72 horas TSH 1188 possui 12 proteínas *up* acumuladas contra seis *down* acumuladas e o genótipo suscetível por sua vez, apresenta cinco proteínas *up* acumuladas e três *down*.

Em 45 dias observamos o mesmo padrão, porém mais acentuado, onde o genótipo resistente apresenta 71 proteínas *up* acumuladas e 27 *down* acumuladas e o genótipo suscetível 25 *up* acumuladas e 48 *down* acumuladas.

Foi verificado a *up* acumulação de proteínas identificadas para o genótipo resistente

em 72 horas, como uma hidrolase, Quitinase A (*spot* 1102), *voltage dependent anion channel* 2 (*spot* 381 *fold change* +1.79), que são proteínas que formam os canais iônicos proteicos mitocondriais mais importantes. Localizados na membrana externa das mitocôndrias. Essas proteínas são responsáveis pela troca de metabólitos como, íons ATP, ADP (Yan *et al.*, 2009) também participam da acumulação da produção de peróxido de hidrogênio (TATEDA *et al.*, 2009) e estão associadas a sinalização de ácido abscísico (YAN *et al.*, 2009). Outro canal proteico sendo *up* acumulado foi a *mitochondrial outer membrane protein porin of 34 KDa* (*spot* 389 *fold change* +1.64).

Dentre as proteínas encontradas no genótipo suscetível em 72 horas, observamos a *up* acumulação de dois *spots* (250 *fold change* +1.5 e 251 *fold change* +2) contendo 5-*methylnetetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase* (Metionina sintase, encontrada apenas neste genótipo), *up* acumulada em relação ao tratamento controle. Foi verificado também a *up* acumulação de uma Proibitina 2 (*spot* 937). Proibitinas compõe um grupo de proteínas altamente conservado tanto em plantas como animais, sendo associadas a diversas funções dentro do metabolismo celular, dentre elas destacam-se, regulação transcricional, envelhecimento, ciclo celular, estresse oxidativo, sinalização e biogênese de mitocôndrias (MISHRA *et al.*, 2006; ARTAL-SANZ e TAVERNARAKIS., 2009; WANG *et al.*, 2010).

Em 72 horas para TSH 1188, dentre as proteínas *down* acumuladas destacam-se uma peroxiredoxina (*spot* 1052), uma chaperonina (*spot* 1033), uma PR-2 (*spot* 1065), que dentro do grupo das PR`s (proteínas relacionada a patogênese) são  $\beta$ -1,3-endoglucanases que atuam contra infecções bióticas. É interessante observar que em 45 DAI duas isoformas de PR-2 foram *down* acumuladas (*spots* 1489, 1431) e 2 isoformas foram *up* acumuladas (*spots* 1170, 1178) e ainda outras PR`s foram identificadas, todas *up* acumuladas exclusivas do genótipo resistente, como duas PR-4: uma PR-4B (quitinase) no *spot* 1065 e uma isoforma de Carrot EP3-3 quitinase putativa no *spot* 1097, uma Taumatina PR-5 (*spot* 1072). PR-5 do tipo osmotinas também apresentaram *spots* bastante acumulados (*spot* 1073 1060 1061), bem como uma PR-10.5 (*spot* 1036).

Também em 72 HAI uma isoforma de inibidor de tripsina (*spot* 974) foi *down* acumulada, no entanto em 45 DAI observamos quatro isoformas de inibidores tripsina *down* acumulados, porém com volumes maiores do que os encontrados em 72 HAI (*spots* 39 *fold change* -2, *spot* 40 *fold change* -3.5, *spot* 42 *fold change* -2.8, e 1482). Esse *down* acúmulo, no

entanto foi em menor grau do que em Catongo, além disso, observamos a *up* acumulação de mais três *spots* contendo inibidores de tripsina (*spots* 1051, 1071 e 1364).

Dentre as proteínas *down* acumuladas para o genótipo suscetível em 72 HAI, destaca-se a ocorrência de alta inibição (*fold change* -11) de uma proteína de choque térmico [*spot* 224 - *stromal 70 kda heat shock-related chloroplastic-like* (HSP 70)]. Um gene codificando para proteínas de choque térmico foi predito como potencialmente envolvido na interação *M. pernicioso* e cacau por GESTEIRA *et al.* (2007), no entanto os perfis de expressão não foram detectados.

Em 45 DAI para o genótipo resistente a *up* acumulação de quatro *spots* (1056, 1057, 1058 e 1124) contendo uma miraculina-like putativa, que são glicoproteínas associadas a respostas de estresse (TALON e GMITTER, 2008). É sugerida a sua atividade contra estresse biótico, limitando o dano celular, principalmente por sua sequência aminoacídica ser parecida com inibidores do tipo Kunitz (TSUKUDA *et al.*, 2006), e a análise por blast desta proteína mostrou similaridade com os inibidores de tripsina de cacau. Outras proteínas *up* acumuladas foram quitinases (*spot* 1097, 1135 e 1125), proteínas de choque térmico HSP 70 isoforma 1 altamente acumulada (*spot* 224 *fold change* + 7.3), HSO70 2 isoforma 2 (*spot* 1284), HSP 89.1 isoforma 1 (*spot* 1321), HSP 17.6 kDa classe II (*spot* 1040), isoformas de hidrolases associadas a resposta a moléculas de origem fúngica (*spot* 1042 e 1037), proteína de canal iônico do tipo *Voltage dependent* (*spot* 1127), uma Proibitina (*spot* 1146), e isoformas de Osmotinas (*spots* 1060, 1061 e 1073).

Quanto à proteínas *down* acumuladas no genótipo resistente observou-se um *spot down* acumulado (*spot* 16 *fold change* -1.69) contendo MLP-like proteína 28 “principal proteína do Latex”. Essas proteínas foram inicialmente identificadas no látex do opium (*Papaver somniferum*) e embora suas funções ainda não sejam totalmente elucidadas, já foram associadas a desenvolvimento de órgãos das plantas bem como a resistência a estresse principalmente por serem membros da superfamília proteica Bem v 1 que inclui dentre outros as proteínas PR-10 (LYTLE *et al.*, 2009). Uma proteína de estresse abscísico de amadurecimento (*spot* 52 *fold change* -8.9) associada estresse salino e osmótico. Foi observado também a *down* acumulação de uma chaperonina (*spot* 417 *fold change* -1.78), uma proteína com domínio de anquirina repetida (*spot* 266 *fold change* -3.3). Essa proteína está associada à regulação de genes codificantes para PR`s, aumento da resposta ao ácido salicílico bem como a regulação positiva da PCD (LU *et al.*, 2003; DONG, 2004).

Em 45 dias no genótipo suscetível como já abordado, existe uma *down* acumulação geral de proteínas associadas a estresse, dentre as identificadas podemos destacar oito *spots* identificados como inibidores de tripsina, três tiveram sua expressão drasticamente diminuída (*spots* 575, *fold change* -5.5, 578, *fold change* -6.3, 580 *fold change*-2) e 5 foram inibidos (*spots* 1670, 1689, 1699, 1744 e 1813). Verificamos a *down* acumulação de duas proibitinas (*spots* 1621, 1629) e de uma Metionina sintase (*spot* 1735) diferente do observado em 72 horas. Dois *spots* (1590 e 1661) contendo MLP-like proteína 28 “principal proteína do Latex”, que foram inibidas. Proteínas de choque térmico HSP 70 (*spot* 1717), HSP 70-1 (*spot* 1825) e HSP 80 (*spot* 1732), uma endoquitinase ácida (*spot* 1816), um *spot* (1693) contendo uma miraculina-like.

Em 45 DAI para o genótipo suscetível observou-se a *up* acumulação de duas proteínas de HSP 70 (*spot* 1551) HSP 70B (*spot* 1525), uma proibitina (*spot* 1523), dois *spots* contendo uma PR-5 foram encontrados (*spots* 583, *fold change* +3.24 e *spot* 1515) duas isoformas de quitinases básicas (*spot* 649, *fold change* +2.3, *spot* 1520) uma endoglucanase (*spot* 658 *fold change* + 3,7), uma isoforma de proteína *com* domínio *de* anquirina repetida (*spot* 1538). O gene para essa proteína foi verificado na biblioteca de cDNA da interação como tendo maior número representativo no genótipo suscetível (GESTEIRA *et al.*, 2007). É válido ressaltar que a *up* acumulação dessa proteína *com* domínio *de* anquirina repetida em Catongo, provavelmente esteja associada PCD neste genótipo, o que pode contribuir para a mudança de fase do fungo (biotrófica para saprofítica) pela liberação de nutrientes para o micélio fúngico (CEITA *et al.*, 2007). Além destas observou-se a *up* acumulação de uma proteína não caracterizada (*Uncharacterized protein* TCM\_004731) no *spot* 1507, encontrada apenas no genótipo suscetível na condição inoculada. A análise por blast da sequência aminoacídica desta proteína mostrou similaridade com *major allergen pru ar 1-like* relacionada à *superfamília* Bet v 1, que são proteínas alergênicas que participam da indução de alergias no homem e em animais, podem estar associadas à resistência, visto sua inclusão na família de PR`s-10 (HAUSER *et al.*, 2008).

**Tabela 5A.** Lista completa de proteínas identificadas para o genótipo TSH 1188, constando as identificações do os tratamentos em 72 horas e 45 dias.

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretical pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
<b>TSH 1188 45 Days after inoculation - exclusive</b>											
1028	Ribosomal protein S11 family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508786141	102	2	14	10.70	16425	-	-	E P	N L C P
1029	Lamin-like protein, putative [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508722685	96	2	20	9.12	15516	-	-	E	V
1030	lectin-related protein precursor [ <i>Citrus x paradisi</i> ]	gi 11596188	275	9	11%	5.10	29300	-	-	E	U
1036	Pathogenesis-related protein 10.5 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508714732	479	13	61	5.14	17529	-	-	S	U
1037	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508703164	118	3	30	6.78	17432	-	-	S E	L
1038	Sedoheptulose-bisphosphatase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508726009	446	11	24	6.56	42692	-	-	S E T O	P
1039	Phosphoglycerate kinase 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508722206	569	13	32	8.49	51447	-	-	E S O N	M C A P
1040	17.6 kDa class II heat shock protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508782734	67	2	16	5.78	17612	-	-	S P	C
1042	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508714812	223	6	41	5.95	18058	-	-	S E	L
1044	cyclophilin [ <i>Gossypium hirsutum</i> ]	gi 194321208	172	6	23	8.62	18504	-	-	P	P L
1045	thioredoxin-dependent peroxidase [ <i>Plantago major</i> ]	gi 52851172	75	2	6	5.34	17495	-	-	O	P L
1048	ATP synthase beta subunit [ <i>Hymenandra wallichii</i> ]	gi 12004141	114	2	5	5.26	52248	-	-	E N	P L
1049	Putative uncharacterized protein	Tc01 g006620	97.67	6	21.1538	9.9	17248	-	-	S P	M
1051	21 kDa seed protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773991	322	9	39	5.71	24264	-	-	S,E	A,L
1052	Serine-threonineprotein kinase plant type putative	Tc06 g015480	99.89	1	3.3333	6.5689	25078	-	-	E T	L
1054	Temperature-induced lipocalin [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508782337	196	5	31	6.43	21539	-	-	E	U
1055	Uncharacterized protein TCM_029925 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508781071	120	1	6	6.12	30496	-	-	E	P
1056	putative miraculin-like protein 2 [ <i>Citrus hybrid cultivar</i> ]	gi 119367468	240	5	32	8.18	23610	-	-	S	U
1057	putative miraculin-like protein 2 [ <i>Citrus hybrid cultivar</i> ]	gi 119367468	487	15	47	8.18	23610	-	-	S	U
1058	putative miraculin-like protein 2 [ <i>Citrus hybrid cultivar</i> ]	gi 119367468	375	10	35	8.18	23610	-	-	S	U
1060	Osmotin 34 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508777410	668	20	52	5.61	27063	-	-	S	A

**Tabela 5A.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
1061	Osmotin 34 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508777410	510	10	44	5.61	27063	-	-	S	A
1062	Photosystem I subunit D-2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508713753	325	8	29	9.60	23284	-	-	F	P
1065	Pathogenesis-related protein PR-4B [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508719169	134	4	17	5.07	23118	-	-	S	U
1067	Triosephosphate isomerase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508726238	99	2	8	8.05	32446	-	-	E P S	A V P M L C
1068	hypothetical protein CICLE_v10000948mg [ <i>Citrus clementina</i> ]	gi 557537483	336	12	23	6.64	57669	-	-	O	P M
1070	RmlC-like jelly roll fold [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508782966	236	5	50	5.05	21245	-	-	E	C
1071	21 kDa seed protein, putative [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508705692	337	6	36	4.67	24085	-	-	S,E	A,L
1072	Thaumatococcus-like protein	Tc03 g027010	100	9	42.8571	7.2036	24187	-	-	S	A
1073	Osmotin 34 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508777409	264	8	34	6.67	25041	-	-	S	A
1075	RNA-binding family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508785585	192	2	15	5.21	21817	-	-	N	C N
1077	N-terminal nucleophile aminohydrolases (Ntn hydrolases) superfamily protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508781876	238	7	33	5.20	25451	-	-	P S E	N C V
1078	Gb:AAF32477.1, putative [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508728011	120	3	18	8.94	21967	-	-	U	U
1079	E3 SUMO protein ligase SIZ1	Tc10 g005140	88.73	2	5.0343	4.8069	96254	-	-	E N S T	N
1082	Putative uncharacterized protein	Tc03 g019960	97.75	1	13.4615	9.7275	5940	-	-	U	M
1086	Plant basic secretory protein (BSP) family protein, putative [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508706482	206	5	23	5.17	26308	-	-	U	U
1087	Aconitase/3-isopropylmalate dehydratase protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508707081	373	9	41	5.75	27034	-	-	E S	P
1088	Plant basic secretory protein (BSP) family protein, putative [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508706482	175	4	23	5.17	26308	-	-	U	U
1089	DSBA oxidoreductase family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508711902	79	2	8	8.73	27254	-	-	S	C
1092	Larreatricin hydroxylase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508781072	74	2	3	6.23	67801	-	-	E	P
1097	Carrot EP3-3 chitinase, putative isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508712825	232	8	16	9.06	37608	-	-	E S	A
1100	Polyphenoloxidase chloroplastic	Tc06 g016300	100	6	7.9174	6.074	65468	-	-	E	P
1104	ascorbate peroxidase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 194346220	201	5	32	5.52	27732	-	-	O	L P
1109	Carbonic anhydrase 2, CA2 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773455	134	3	15	5.48	29957	-	-	E F	P

**Tabela 5A.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
1110	FtsH extracellular protease family isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508708032	61	3	3	6.11	74454	-	-	P N E	L
1111	hypothetical protein CICLE_v10032737mg [ <i>Citrus clementina</i> ]	gi 557539313	77	2	14	5.69	24775	-	-	E	U
1113	NagB/RpiA/CoA transferase-like superfamily protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508776413	63	2	9	7.71	34878	-	-	S E	P L
1115	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508783714	156	5	23	6.06	27741	-	-	E	C
1118	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein, putative [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508704141	284	7	33	6.05	32839	-	-	N E S	C
1120	Serine-threonine protein kinase plant type putative	Tc06 g015480	99.77	1	3.3333	6.5689	68386	-	-	E T	L
1121	Serine-threonine protein kinase plant type putative	Tc06 g015480	98.16	2	6.1905	6.5689	68386	-	-	E T	L
1122	hypothetical protein TCM_036960 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508782161	92	4	16	6.50	32961	-	-	E	U
1124	putative miraculin-like protein 2 [ <i>Citrus hybrid cultivar</i> ]	gi 119367468	366	11	42	8.18	23610	-	-	S	U
1125	Carrot EP3-3 chitinase, putative isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508712825	608	21	49	9.06	37608	-	-	E S	A
1127	Voltage dependent anion channel 2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508699781	235	8	35	8.88	29410	-	-	E S	M P L V
1128	6-phosphogluconate dehydrogenase family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508706166	158	3	16	6.84	32438	-	-	E N	U
1129	Cationic peroxidase 2 precursor [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508706941	1142	30	33	9.41	55145	-	-	O	U
1130	Phosphatase 2C family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508721173	213	4	13	6.02	31588	-	-	E	U
1132	Cationic peroxidase 2 precursor [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508706941	983	20	36	9.41	55145	-	-	O	U
1133	Ribosomal protein S3 family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508782763	202	6	23	9.42	27058	-	-	N S	V N L P
1135	class I chitinase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 545912031	360	17	31	5.24	35798	-	-	S E T	L V
1136	6-phosphogluconate dehydrogenase family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508783393	68	2	8	8.87	36039	-	-	E N	U
1138	Glycosyl hydrolase superfamily protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508714796	267	13	15	6.45	46794	-	-	E S	V
1139	elongation factor 2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 95116530	76	1	20	8.98	8638	-	-	N S	N C L P
1141	Cationic peroxidase 2 precursor [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508706941	443	8	21	9.41	55145	-	-	O	U

**Tabela 5A.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
1142	Ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein isoform 2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508712299	156	6	32	9.22	21174	-	-	F S	P
1143	malate nad-dependent [Moniliophthora roreri MCA 2997] protege contra stress oxidativo em escherichia	gi 554912645	184	4	17	6.09	34177	-	-	E	U
1146	Prohibitin 2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508707647	470	9	37	9.43	32178	-	-	S E	V M P
1147	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508718233	163	4	16	6.95	36026	-	-	E	U
1148	E3 SUMO protein ligase SIZ1	Tc10_g005140	100	2	3.7757	4.8069	96254	-	-	E N S T	N
1151	Pectinacetylerase family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508778145	364	11	30	8.56	44481	-	-	E	A
1152	Mercaptopyruvate sulfurtransferase 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508722224	183	5	16	6.50	41907	-	-	E	U
1153	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein, putative isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508715524	157	5	5	7.84	150374	-	-	E	P
1154	E3 SUMO protein ligase SIZ1	Tc10_g005140	99.77	1	2.2883	4.8069	96254	-	-	E N S T	N
1157	Zinc-binding dehydrogenase family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508716735	300	12	33	5.58	38902	-	-	O N	C
1160	Late embryogenesis abundant protein, group 2 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508715071	868	25	49	4.71	34564	-	-	S E	C L
1162	Translocase of the outer mitochondrial membrane 40 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508707145	64	1			34956	-	-	E	M L
1163	Proline iminopeptidase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508705382	104	2	6	6.02	45065	-	-	P	C P
1164	UDP-D-glucose/UDP-D-galactose 4-epimerase 5 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508777788	239	8	31	6.03	38590	-	-	E S N	C
1165	E3 SUMO protein ligase SIZ1	Tc10_g005140	99.85	2	4.9199	4.8069	96254	-	-	E N S T	N
1166	E3 SUMO protein ligase SIZ1	Tc10_g005140	99.8	1	2.2883	4.8069	96254	-	-	E N S T	N
1168	hypothetical protein CICLE_v10032406mg [ <i>Citrus clementina</i> ]	gi 557539217	243	5	15	6.09	26313	-	-	O	M
1169	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508710485	428	11	35	5.43	34130	-	-	E	U
1170	Pathogenesis-related protein P2 isoform 2, partial [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508719161	308	8	24	4.26	29607	-	-	S	C



**Tabela 5A.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
1172	GDSL-motif lipase 2, putative [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508706921	112	2	6	7.09	41982	-	-	E S T	A
1173	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508713132	121	3	10	6.38	40530	-	-	E	L P
1175	Putative uncharacterized protein	Tc03 g019960	100	1	13.4615	9.7275	5940	-	-	U	M
1176	Putative Endo 1 3 4 beta glucanase 1	Tc00 g009650	86.86	3	7.8488	5.6572	77266	-	-	E	U
1178	Pathogenesis-related protein P2 isoform 2, [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508719161	150	4	19	4.26	29607	-	-	S	C
1182	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508713132	514	15	36	6.38	40530	-	-	E	L P
1184	Flavanone 3-hydroxylase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508698958	677	16	54	5.25	41305	-	-	E	U
1186	Hypothetical protein	Tc04 g020110	97	3	9.9796	9.9783	43568	-	-	U	U
1189	Glutamine synthetase 1,4 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508707247	547	19	49	6.02	39269	-	-	E N	C
1191	Serine-threonine protein kinase plant type putative	Tc06 g015480	100	1	3.3333	6.5689	68386	-	-	E T	L
1192	Serine-threonine protein kinase plant type putative	Tc06 g015480	98.53	1	3.3333	6.5689	68386	-	-	E T	L
1193	NagB/RpiA/CoA transferase-like superfamily protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508782976	71	2	8	6.38	45527	-	-	E N	N C A
1194	Pectinacetyltransferase family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508778145	207	5	17	8.56	44481	-	-	E	A
1197	Hypothetical protein	Tc04 g020110	85.24	1	5.2953	9.9783	43568	-	-	U	U
1198	Vacuolar ATP synthase subunit C (VATC) / V-ATPase C subunit / vacuolar proton pump C subunit (DET3) [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508711023	117	3	8	5.43	42678	-	-	P E S	V P C L
1201	Uncharacterized protein TCM_007589 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508707028	65	3	6	5.22	41247	-	-	E	C
1202	E3 SUMO protein ligase SIZ1	Tc10 g005140	100	2	4.2334	4.8069	96254	-	-	E N S T	N
1203	Ankyrin repeat domain containing protein 2	Tc02 g012840	100	5	24.9191	4.2336	33318	-	-	S P	N C P L
1205	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508704220	369	7	30	4.71	40630	-	-	E N P	P
1206	Peptidase M20/M25/M40 family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508776758	256	6	20	5.32	53367	-	-	E P	C

**Tabela 5A.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
1209	Alcohol dehydrogenase 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508724716	278	7	30	6.56	42553	-	-	E	L
1210	Alpha-amylase-like [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508722567	74	4	9	4.89	50498	-	-	E S	C A
1214	Aldolase-type TIM barrel family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508707705	427	7	20	5.61	48136	-	-	E	M C P
1216	Peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 3 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508713478	292	7	21	7.96	49514	-	-	E P S T	V P M N C
1220	Putative disease resistance protein At5g05400	Tc03_g012900	91.13	2	8.1395	5.718	39158	-	-	S N	U
1222	Peroxidase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508724908	328	7	23	5.64	39488	-	-	O	V
1224	Peroxidase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508724908	593	10	39	5.64	39488	-	-	O	V
1225	Putative Beta xylosidase alpha L arabinofuranosidase 2	Tc04_g030450	100	3	5.8971	5.1288	88098	-	-	E	U
1226	Citrate synthase 2 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508701058	87	1	2	8.92	56196	-	-	E P	C
1227	SEC14 cytosolic factor family protein / phosphoglyceride transfer family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508725442	87	4	6	4.79	69922	-	-	E	C
1229	eukaryotic initiation factor 4A [ <i>Oryza sativa Japonica</i> Group]	gi 303844	129	4	15	5.29	47187	-	-	E N	N C L
1230	Hyaluronan / mRNA binding family isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508704588	289	6	12	7.72	40021	-	-	U	C N L
1231	Tubulin alpha-5 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508725442	303	10	29	4.97	50370	-	-	P	C
1232	Putative Aspartic proteinase nepenthesin 1	Tc10_g014660	100	7	15.1515	8.8583	46303	-	-	P	P A
1233	beta-tubulin [ <i>Medicago falcata</i> ]	gi 14331109	209	7	11	4.73	48654	-	-	P N	C
1234	Clathrin light chain protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508781043	59	1	3	5.45	38171	-	-	E P	L C
1237	Tubulin beta 8 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508786602	747	22	43	4.76	50674	-	-	P N E	C
1238	F1-ATPase alpha subunit [ <i>Alania endlicheri</i> ]	gi 34539171	66	2	6	6.90	44939	-	-	E N	M
1239	Enolase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508775701	140	5	14	5.84	48181	-	-	E	C
1247	Ketol-acid reductoisomerase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508700932	378	10	18	7.18	64137	-	-	E S N	M A P C
1248	E3SUMO protein ligase SIZ1	Tc10_g005140	99.88	2	5.8352	4.8069	96254	-	-	E N S T	N
1255	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508784980	106	2	4	5.62	64513	-	-	P N S	C A P N M L

**Tabela 5A.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
1256	Epidermis-specific secreted glycoprotein EP1	Tc07 g009500	99.62	9	21.3303	8.1381	48234	-	-	U	U
1259	catalase isozyme p [ <i>Moniliophthora roreri</i> MCA 2997]	gi 554906367	235	5	11	6.92	59535	-	-	E O	U
1263	Putative disease resistance protein At5g05400	Tc03 g012900	97.66	1	5.2326	5.718	39158	-	-	S N	U
1267	hypothetical protein CICLE_v10026034mg [ <i>Citrus clementina</i> ]	gi 557527768	692	17	44	5.83	35583	-	-	F S N	P
1268	Non-specific phospholipase C3 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508718415	74	2	6	5.09	57908	-	-	S E	V L
1272	Putative disease resistance protein At5g05400	Tc03 g012900	97.57	2	8.7209	5.718	39158	-	-	S N	U
1273	3,4-dihydroxy-2-butanone kinase, putative [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508774268	64	3	9	5.21	62031	-	-	E S N	C
1274	Putative uncharacterized protein	Tc03 g019960	92.04	1	13.4615	9.7275	5940	-	-	U	M
1276	Phosphoglucomutase/phosphomannomutase family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508709149	138	5	11	5.40	63508	-	-	E S	C P N L A
1282	Putative uncharacterized protein	Tc08 g004600	87.65	1	5.8333	10.53	13808	-	-	U	U
1284	Mitochondrial HSO70 2 isoform 2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508706435	147	3	6	5.71	72603	-	-	P N S O	M L P V
1285	Succinate dehydrogenase ubiquinone flavoprotein subunit 1 mitochondrial	Tc01 g003300	90.43	19	36.767	6.1888	69764	-	-	E	M
1289	Gag/pol polyprotein	Tc00 g054631	99.91	7	8.7191	8.556	106974	-	-	U	U
1298	AAA-type ATPase family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508780984	94	2	4	6.00	75294	-	-	N	V
1302	Glycosyl hydrolase family 38 protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508775377	72	2	2	6.00	114566	-	-	E	V A
1303	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 328924791	404	14	14	6.04	53512	-	-	F E	P
1304	6-phosphogluconate dehydrogenase [ <i>Moniliophthora roreri</i> MCA 2997]	gi 554917403	227	3	10	7.66	53801	-	-	E N	U
1305	Hypothetical protein	Tc04 g020110	97.22	1	5.2953	9.9783	43568	-	-	U	U
1308	Hypothetical protein	Tc04 g020110	99.99	3	8.9613	9.9783	43568	-	-	U	U
1321	Heat shock protein 89.1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508701560	67	2	3	5.49	92316	-	-	P S	P M
1328	Hypothetical protein	Tc05 g010170	99.39	3	5.7018	8.6061	78547	-	-	N P E	P
1339	ATP synthase beta subunit [ <i>Gustavia superba</i> ]	gi 6687627	154	4	13	5.08	53789	-	-	E N	P M

**Tabela 5A.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
1340	AT4g39900/T5J17_70	Tc01 g008910	95.99	2	11.7886	5.3079	27368	-	-	E	N
1343	Amidase family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508718572	93	2	7	8.88	56405	-	-	E	U
1348	Putative uncharacterized protein	Tc03 g019960	99.92	1	13.4615	9.7275	5940	-	-	U	M
1353	Putative uncharacterized protein	Tc03 g019960	87.31	2	21.1538	9.7275	5940	-	-	U	M
1359	Putative uncharacterized protein	Tc03 g019960	99.16	1	13.4615	9.7275	5940	-	-	U	M
1360	Cystathionine beta-synthase (CBS) family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508698668	183	8	30	8.99	22774	-	-	S N E	M
1362	40S ribosomal protein S15-like isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508714008	92	2	19	10.54	17182	-	-	N	N L
1364	21 kDa seed protein, putative [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508705692	346	7	25	4.67	24085	-	-	S,E	A,L
1366	Hypothetical protein	Tc00 g090361	99.89	2	5.1693	8.3818	65385	-	-	N	M
1367	Triosephosphate isomerase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508726238	315	6	30	8.05	32446	-	-	E P S	A V P M L C
1369	Putative DNA polymerase ETA	Tc02 g000310	100	6	9.6154	6.5565	81293	-	-	N	N
1373	RP non-ATPase subunit 8A [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508715376	440	11	41	6.01	35211	-	-	P	U
1374	Malate dehydrogenase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508780802	267	8	28	8.41	37270	-	-	E S	A P M
1377	Pectin methylesterase 3 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508780136	177	4	10	8.87	64376	-	-	E	A
1386	Uncharacterized protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508784176	102	3	10	7.56	44833	-	-	E	A
1387	hypothetical protein [Citrus x paradisi]	gi 2213425	200	3	14	5.46	32737	-	-	S E	V L C P
1399	Putative uncharacterized protein	Tc05 g002851	99.99	1	4.7733	6.7072	47204	-	-	N	U
1401	Class III peroxidase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508699742	975	25	51	9.01	36075	-	-	O	U
<b>TSH 1188 45 Days not inoculated- exclusive</b>											
1407	hypothetical protein CICLE_v10032502mg [ <i>Citrus clementina</i> ]	gi 557539279	221	5	28	8.97	28021	-	-	F N	P A
1408	21 kDa seed protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773991	618	13	39	5.71	24264	-	-	S,E	A,L
1411	Photosystem I subunit D-2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508713753	241	5	37	9.60	23284	-	-	F	P
1413	N-terminal nucleophile aminohydrolases (Ntn hydrolases) superfamily protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508781876	76	2	11	5.20	25451	-	-	P S E	N C V
1414	Putative Pentatricopeptide repeat containing protein At4g04790 mitochondrial	Tc07 g004970	98.73	7	8.3411	6.4464	122384	-	-	U	M

**Tabela 5A.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretical pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
1415	Photosystem II light harvesting complex gene 2.1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508701569	137	4	25	5.44	28689	-	-	F	P L
1419	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein, putative [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508704141	59	1	4	6.05	32839	-	-	E S	L
1420	Phosphomannomutase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508704135	160	4	23	5.84	28322	-	-	E S P T	C
1421	Peroxidase superfamily protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508728142	168	6	21	9.40	35143	-	-	S O	U
1422	Hypothetical protein	Tc00_g090361	100	4	10.1604	8.3818	65385	-	-	N	M
1431	Pathogenesis-related protein P2 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508719160	154	5	12	4.36	29891	-	-	S	C
1432	Peroxidase superfamily protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508728128	368	10	29	8.27	34751	-	-	O	U
1434	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508726180	242	4	15	5.56	48566	-	-	E N S F	P A N
1439	Alcohol dehydrogenase 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508724716	306	7	28	6.56	42553	-	-	E	U
1443	Beta-6 tubulin [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508777469	105	4	5	4.83	50724	-	-	P N E	C
1449	Ketol-acid reductoisomerase chloroplastic	Tc01_g013560	100	13	25.5102	7.2378	63624	-	-	E S N	M A P C
1454	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508784980	264	7	16	5.62	64513	-	-	P E N S	C A P N M
1455	3,4-dihydroxy-2-butanone kinase, putative [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508774268	116	4	13	5.21	62031	-	-	E S B N	C
1458	RNA-binding KH domain-containing protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508719137	88	1	3	4.88	53664	-	-	N	N
1459	ATP citrate lyase subunit B 2 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508714833	134	4	9	7.95	66505	-	-	E	C
1461	NADP-dependent malic enzyme	Tc09_g009030	99.14	17	36.2098	6.4719	65057	-	-	E N P	C
1473	Putative disease resistance protein At5g05400	Tc03_g012900	100	1	5.2326	5.718	39158	-	-	S N	U
1476	ATP synthase beta subunit [ <i>Apium graveolens</i> ]	gi 7706852	143	3	3	5.14	52979	-	-	E N	P L M
1477	hypothetical protein CICLE_v10026034mg [ <i>Citrus clementina</i> ]	gi 557527768	216	8	19	5.83	35583	-	-	F S N	P

**Tabela 5A.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
1482	21 kDa seed protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773991	68	2	14	5.71	24264	-	-	S,E	A,L
1484	Polyphenol oxidase chloroplastic	Tc06_g016300	100	7	8.2616	6.074	65468	-	-	E	P
1488	hypothetical protein CICLE_v10012049mg [ <i>Citrus clementina</i> ]	gi 557532346	66	2	14	6.96	36597	-	-	E S	M A N C L
1489	Pathogenesis-related protein P2 isoform 2, partial [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508719161	212	5	20	4.26	29607	-	-	S	L
1490	Peroxidase superfamily protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508728128	191	3	14	8.27	34751	-	-	O	U
<b>TSH 1188 45 Days – differential</b>											
0	Class II aaRS and biotin synthetases superfamily protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508703557	80	2	5	6.21	58073	UP	2.559	N	C
11	Plastocyanin 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508723249	335	14	52	4.79	16831	DOWN	2.417	E	U
13	Nucleoside diphosphate kinase family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508704597	537	13	44	6.31	16497	UP	1.642	N	U
16	MLP-like protein 28 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508709120	355	7	30	5.30	17667	DOWN	1.69	S	N P
17	Copper/zinc superoxide dismutase 2 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508786427	262	8	37	6.34	22937	UP	2.129	S O	P A
39	21 kDa seed protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773991	1128	27	56	5.71	24264	DOWN	2.013	S,E	A,L
40	21 kDa seed protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773995	1284	43	60	5.94	24263	DOWN	3.559	S,E	A,L
42	21 kDa seed protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773991	1139	25	56	5.71	24264	DOWN	2.852	S,E	A,L
51	Translationally-controlled tumor protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508719613	127	5	35	4.60	19162	-	1.427	-	-
52	Abscisic stress ripening protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508724868	86	10	14	6.17	16232	DOWN	8.911	S	U
63	Quinone reductase family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508720763	180	3	15	6.21	21669	UP	4.991	E	V L
64	Light-harvesting chlorophyll B-binding protein 3 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508720888	130	4	16	5.65	28713	DOWN	2.003	F E	P
65	Superoxide dismutase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508728253	222	7	26	7.14	25748	UP	1.926	O	M
73	Chlorophyll a-b binding protein 3, chloroplastic [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508701741	211	7	20	6.85	29725	DOWN	1.761	F	P
76	Glutathione S-transferase PHI 9 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508701212	178	7	28	5.68	25239	UP	1.693	P	C

**Tabela 5A.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
81	Chalcone-flavanone isomerase family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508728225	333	6	34	4.98	29532	UP	6.434	E	U
83	Putative uncharacterized protein	Tc03_g019960	99.63	1	13.4615	9.7275	5940	UP	1.641	U	M
94	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508780514	200	6	19	5.13	28219	DOWN	2.291	F	P
95	GTP binding Elongation factor Tu family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508715870	407	10	18	8.99	63093	DOWN	4.482	N	C
96	ascorbate peroxidase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 194346220	163	7	32	5.52	27732	UP	1.614	O S	P L
115	Tropinone reductase homolog At1g07440	Tc09_g031130	99.96	16	44.1696	5.6841	30234	DOWN	2.646	E	U
120	Uncharacterized protein TCM_030935 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508720517	134	3	11	5.38	42636	DOWN	2.38	E S	A
129	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein, putative [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508704142	71	3	16	5.62	32825	DOWN	2.54	E	U
149	Voltage dependent anion channel 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508711479	568	14	39	8.39	29642	-	1.302	-	-
152	Predicted protein	Tc01_g039680	99.4	3	8.4746	6.5447	52059	UP	4.586	U	U
163	Annexin 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508724122	720	17	54	6.34	36094	UP	1.682	E O	V A C P L M
177	Peroxidase superfamily protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508728142	203	7	29	9.40	35143	UP	3.583	O	A
179	Late embryogenesis abundant protein, group 2 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508715071	656	16	51	4.71	34564	-	1.493	-	-
181	Protochlorophyllide oxidoreductase A [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508720970	712	16	45	9.12	43365	DOWN	2.182	F E	P
197	Pectate lyase family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508708852	182	4	14	7.27	45271	DOWN	2.107	E	A
200	PfkB-like carbohydrate kinase family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508712952	211	6	22	5.26	35376	UP	5.102	E	L
206	Aldolase superfamily protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508716231	173	4	17	6.50	41322	UP	1.802	S E	C N M P L A
209	Zinc-binding dehydrogenase family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508712661	147	3	4	5.84	77119	DOWN	1.696	E	U
220	Larreatricin hydroxylase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508781072	257	9	12	6.23	67801	UP	1.681	E	P
224	Chloroplast heat shock protein 70 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508712739	74	3	8	5.67	71583	UP	7.391	P S	M P N A

**Tabela 5A.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
226	Larreatricin hydroxylase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508781069	138	3	7	5.95	67849	UP	2.344	E	P
227	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508710485	660	14	53	5.43	34130	UP	2.505	E	U
232	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508710772	365	6	31	8.51	35816	UP	3.858	E S O	N M L A
255	Caffeic acid 3-O-methyltransferase 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508776460	282	9	31	5.32	40531	-	1.463	-	-
266	Ankyrin repeat domain-containing protein 2 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508707078	234	6	20	4.51	38670	DOWN	3.326	P S	P N L
289	Actin 7 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508700514	206	7	17	6.08	57488	DOWN	2.289	E S	P N L C M
291	Alcohol dehydrogenase 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508724716	269	10	47	6.56	42553	UP	3.533	E	L
293	GDP-mannose 3,5-epimerase 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508719181	78	3	10	6.88	48472	DOWN	1.733	E	C
294	Alcohol dehydrogenase 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508724716	512	16	64	6.56	42553	DOWN	4.907	E	L
298	Methionine adenosyltransferase 3 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508716039	218	6	21	6.08	43059	DOWN	14.83	S	C L
315	Phospholipase A 2A, IIA,PLA2A isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508722631	60	2	5	5.68	48053	-	1.292	-	-
327	Regulatory particle triple-A 1A [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508780159	291	9	20	6.04	48208	DOWN	2.683	P E N	C N L
341	Elongation factor 1-gamma 3 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508705116	204	7	19	5.95	48396	UP	1.565	P E	V L
353	Amidase family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508718572	74	4	15	8.88	56405	DOWN	3.979	E	U
358	ribulose-bisphosphate carboxylase [Burretiodendron esquirolii]	gi 4995077	490	12	25	6.04	52001	DOWN	1.655	E F	P
370	Serine hydroxymethyltransferase 4 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508713247	534	12	29	7.15	52261	-	1.309	-	-
395	Ketol-acid reductoisomerase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508700933	79	3	6	5.71	57064	-	1.446	-	-
398	Insulinase (Peptidase family M16) protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508711724	134	3	8	6.49	59199	UP	1.56	P E S	V M C N L
417	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508784980	403	8	20	5.62	64513	DOWN	1.789	E P S	P A N L C
429	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508787184	794	16	29	5.06	64075	-	1.157	-	-



**Tabela 5A.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretical pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
430	Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate-independent isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508712849	731	18	47	5.60	61349	DOWN	1.585	S E	L M P C A
455	DC1 domain-containing protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508708602	791	18	33	4.96	65561	UP	1.893	E	C
489	NADH-ubiquinone dehydrogenase, mitochondrial, putative isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508711309	71	3	3	6.29	81886	DOWN	1.63	O P E	P
503	Chaperone protein htpG family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508709661	147	3	5	4.99	90371	DOWN	2.138	P S	U
531	Cysteine synthase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508719254	223	4	16	5.22	34424	DOWN	3.167	E	P N L A
<b>TSH 1188 72 Hours after inoculation - exclusive</b>											
1089	Putative uncharacterized protein	Tc03 g019960	99.99	1	13.4615	9.7275	5940	-	-	U	M
1092	Ribosomal protein S3 family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508782763	277	4	20	9.42	27058	-	-	S N E	V N L P
1095	Alcohol dehydrogenase 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508724716	284	7	25	6.56	42553	-	-	E	U
1096	S-methyl-5-thioribose kinase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508706478	158	4	11	5.59	50906	-	-	E N	C
1097	GDP-mannose 3,5-epimerase 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508719181	211	7	16	6.88	48472	-	-	E N	C
1098	Tubulin alpha-2 chain [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508706624	473	11	34	4.93	50327	-	-	P N E	C
1099	Putative uncharacterized protein	Tc03 g019960	98.38	2	13.4615	9.7275	5940	-	-	U	M
1100	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508715552	260	3	6	8.77	62893	-	-	S T E F O	P A
1101	Tubulin beta-1 chain [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508723137	370	11	33	4.71	51287	-	-	P E N	C V
1102	Chitinase A [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508703925	125	5	14	4.30	31871	-	-	E S	A
1103	Putative uncharacterized protein	Tc08 g004600	99.43	2	9.1667	10.53	13808	-	-	U	U
1106	Glycosyl hydrolase family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508785941	94	2	4	9.07	65484	-	-	E	U
1112	Hypothetical protein	Tc05 g010170	99.82	5	8.4795	8.6061	78547	-	-	N P E	P
1113	Putative uncharacterized protein	Tc03 g019960	99.91	1	13.4615	9.7275	5940	-	-	U	M
1114	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508715552	96	2	5	8.77	62893	-	-	S T E F O	P A
1115	Predicted protein	Tc03 g006880	99.51	6	2.6316	5.9676	154944	-	-	E	U

**Tabela 5A.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
1119	Hypothetical protein	Tc04 g020110	94.43	1	5.2953	9.9783	43568	-	-	U	U
1120	Putative Beta xylosidase alpha L arabinofuranosidase 2	Tc04 g030450	99.16	3	5.0188	5.1288	88098	-	-	E	U
1122	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2 isoform 2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508710773	744	18	50	8.51	36856	-	-	E O S	C A P M N L
1123	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508710772	363	7	32	8.51	35816	-	-	E O S	C A P M N L
1125	GTP binding Elongation factor Tu family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508785826	105	4	10	9.15	49703	-	-	N	C
1126	SKU5 similar 5 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508723283	380	8	18	8.90	60173	-	-	E	U
1127	Vacuolar ATP synthase subunit A isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508779047	115	3	6	5.64	73558	-	-	E N S P	L A P V
1130	Hypothetical protein	Tc00 g090361	95.69	5	9.0909	8.3818	65385	-	-	N	M
1132	Putative uncharacterized protein	Tc03 g019960	99.46	2	23.0769	9.7275	5940	-	-	U	M
1133	Putative uncharacterized protein	Tc03 g019960	99.53	1	13.4615	9.7275	5940	-	-	U	M
1136	Hypothetical protein	Tc05 g010170	99.85	2	2.6316	8.6061	78547	-	-	N P E	P
1138	Putative uncharacterized protein	Tc03 g019960	100	1	13.4615	9.7275	5940	-	-	S E	P L
1142	Pentatricopeptide repeat containing protein At2g29760 chloroplastic	Tc09 g030080	99.47	2	5.8663	7.3623	81943	-	-	U	M
<b>TSH 1188 72 Hours not inoculated - exclusive</b>											
974	21 kDa seed protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773991	296	6	22	5.71	24264	-	-	S,E	A,L
975	60S ribosomal protein L11 2	Tc06 g014090	90.63	6	28.5714	10.2682	20761	-	-	E P	V N C
978	Glutathione S transferase DHAR1 mitochondrial	Tc00 g015640	98.56	10	46.6981	5.7144	23439	-	-	E	C L
980	Polyphenol oxidase chloroplastic	Tc06 g016300	98.93	8	7.7453	6.074	65468	-	-	E	P
984	60S ribosomal protein L13 1	Tc01 g016490	99.39	5	16.1157	11.3589	27775	-	-	P	C N L
1005	Peroxidase 4	Tc10 g016040	100	5	17.9811	8.2828	34298	-	-	O	U
1006	Class III peroxidase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508699742	65	2	7	9.01	36075	-	-	O	U
1008	Malatedehydrogenase mitochondrial	Tc07 g009370	100	15	61.6519	8.5199	35372	-	-	E	U
1009	Lactate/malate dehydrogenase family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508721295	237	6	22	8.52	35601	-	-	E S N	A P M
1011	Polyphenol oxidase chloroplastic	Tc06 g016300	100	10	21.8589	6.074	65468	-	-	E	P
1012	Larreatricin hydroxylase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508781072	75	2	4	6.23	67801	-	-	E	P

**Tabela 5A.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
1013	Polyphenol oxidase chloroplastic	Tc06 g016300	100	16	30.1205	6.074	65468	-	-	E	P
1015	Pectinacetylsterase family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508778145	257	5	18	8.56	44481	-	-	E	C
1033	Chaperonin CPN60 2 mitochondrial	Tc04 g022140	99.97	40	64	5.3557	61412	-	-	P E N S O	C M V
1036	Subtilisin-like protease	Tc02 g005130	100	13	16.0207	7.9438	82078	-	-	P E	A
1039	L-ascorbate oxidase homolog	Tc08 g004490	100	8	17.3752	8.9216	59959	-	-	E	A
1052	2-cysteine peroxiredoxin B [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508716535	72	2	11	7.66	29429	-	-	O S	A P
1055	Chalcone--flavonone isomerase	Tc00 g015860	100	9	45.8874	5.0795	24754	-	-	E	U
1065	Pathogenesis-related protein P2 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508719160	94	1	4	4.36	29891	-	-	S	U
<b>TSH 1188 72 Hours - differential</b>											
357	Hypothetical protein	Tc06 g016290	100	3	11.7089	5.9938	34593	UP	3.187	E	P
365	20S proteasome beta subunit G1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508719769	171	5	27	7.03	27716	UP	1.638	E P S	C
381	Voltage dependent anion channel 2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508699781	144	4	13	8.88	29410	UP	1.792	E S	M V P
389	Voltage dependent anion channel 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508711479	159	4	23	8.39	29642	UP	1.646	E S	M V N P L
410	Protochlorophyllide oxidoreductase A [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508720970	566	16	29	9.12	43365	DOWN	1.931	E F	P
439	Larreatricin hydroxylase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508781069	263	6	14	5.95	67849	DOWN	2.992	E	P
444	Larreatricin hydroxylase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508781072	308	10	15	6.23	67801	-	1.245	-	-
446	Larreatricin hydroxylase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508781072	609	20	22	6.23	67801	-	1.326	-	-
451	40s ribosomal protein SA [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508780104	183	6	20	5.04	34384	DOWN	1.506	P S E	C P N
468	Phosphoglycerate kinase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508722207	304	10	20	5.89	42379	-	1.181	-	-
516	Argininosuccinate synthase chloroplastic	Tc03 g014630	99.96	21	39.6761	6.2346	54096	UP	4.346	E	U
518	Putative uncharacterized protein	Tc08 g004600	94.36	1	5.8333	10.53	13808	UP	6.641	U	U
532	Eukaryotic translation initiation factor 4A1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508779901	69	2	6	5.38	47259	-	1.494	-	-
540	Tubulin beta 7 chain	Tc03 g027380	100	25	42.3423	4.6412	50039	UP	1.916	P N E	C
543	Elongation factor 1-gamma 3 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508705116	217	9	19	5.95	48396	-	1.345	-	-
552	ribulose-bisphosphate carboxylase [ <i>Burretiodendron esquirolii</i> ]	gi 4995077	529	13	29	6.04	52001	-	1.416	-	-

**Tabela 5A.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
562	Serine hydroxymethyltransferase 4 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508713247	275	8	20	7.15	52261	-	1.451	-	-
564	Epidermis-specific secreted glycoprotein EP1	Tc07 g009500	97.73	11	27.2936	8.1381	48234	UP	3.414	E	U
605	D-3-phosphoglyceratedehydrogenase chloroplastic	Tc02 g009410	99.94	18	38	7.2816	63496	-	1.43		
606	Putative uncharacterized protein	Tc08 g004600	96.07	1	5.8333	10.53	13808	UP	1.647	U	U
613	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508712326	89	2	4	5.97	59526	-	1.441	-	-
646	Dynamamin-related protein 1E	Tc10 g000170	100	25	52.7716	8.7015	50740	-	1.35	-	-
658	Heat shock 70 kDa protein mitochondrial	Tc09 g013630	100	30	40.1773	5.5629	72335	-	1.459	-	-
668	Chloroplast heat shock protein 70 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508712739	321	9	12	5.67	71583	-	1.421	-	-
768	Ribosomal protein L14 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508714193	230	7	50	10.19	15367	DOWN	1.897	P	V N P L

- a. Número de acesso: Números precedidos por “gi|” correspondem às identificações realizadas no banco de dados NCBIInr. Números precedidos por “Tc” correspondem às identificações realizadas diretamente no banco de dados do *Theobroma cacao*, via ProteinLynx.
- b. Para as identificações realizadas no banco de dados do *Theobroma cacao* o *score* é dado em forma de porcentagem de probabilidade. Para as identificações realizadas no NCBIInr, o *score* é baseado nos seguintes parâmetros: *Ions score* é de  $-10 \cdot \log(P)$ , onde P é a probabilidade de que o *match* observado seja um evento aleatório. *Scores* de ions > 55 indicam identidade ou extensiva homologia ( $p < 0.05$ ). Os *scores* da proteína são derivados dos *scores* dos íons como uma base não probabilística para o ranqueamento dos *hits* proteicos com mais identidade.
- c. Categorização de funções biológicas realizadas através do *software* Blast2Go: O, Estresse oxidativo; S, Defesa e estresse; F, Fotossíntese; E, Metabolismo e energia; T, Transdução de sinal; N, Metabolismo de ácidos nucléicos; P, Metabolismo de proteínas; U, Desconhecida.
- d. Categorização de localização celular realizada através do *software* Blast2Go: P, Cloroplasto; M, Mitochondria; C, Citoplasma; L, Membrana plasmática; N, Núcleo; V, Vacúolo; A, Apoplasto; U, Desconhecida.

**Tabela 5B.** Lista de proteínas identificadas para o genótipo Catongo.

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretical pI	Nominal mass (Mr)	UP/DOWN	Fold	Biologic function	Cellular localization
<b>Catongo 45 Days after inoculation - exclusive</b>											
1505	Calcium-binding EF-hand family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508777222	107	3	17	4.82	16501	-	-	SE	C L N
1507	Uncharacterized protein TCM_004731 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508703278	478	10	61	5.57	17857	-	-	S	U
1508	60S ribosomal protein L23	Tc01 g025870	100	4	40	10.8252	15003	-	-	N	M C N P
1509	Glycine-rich RNA-binding protein 7 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508706123	87	2	15	8.75	17363	-	-	N E S	A P N C M
1510	Putative uncharacterized protein	Tc08 g004600	91.84	2	5.8333	10.53	13808	-	-	U	U
1511	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508703164	118	4	14	6.78	17432	-	-	E S	L V
1512	Putative uncharacterized protein	Tc08 g004600	100	2	5.8333	10.53	13808	-	-	U	U
1513	Putative uncharacterized protein	Tc08 g004600	96.61	2	5.8333	10.53	13808	-	-	U	U
1514	hypothetical protein CICLE_v10000948mg [ <i>Citrus clementina</i> ]	gi 557537483	203	5	12	6.64	57669	-	-	O	P M
1515	Osmotin 34 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508777409	176	6	32	6.67	25041	-	-	S	A
1516	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508719309	181	4	18	8.59	32389	-	-	N E	P
1518	Carbonic anhydrase 2, CA2 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773455	635	13	44	5.48	29957	-	-	E F	P
1519	Photosystem II subunit O-2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508699354	695	18	44	5.85	35364	-	-	N F S P	A P
1520	Basic chitinase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508698809	304	10	37	8.33	34324	-	-	E S	V L
1521	ATP synthase CF1 alpha subunit [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 313199688	884	25	28	5.19	55336	-	-	N E	P M
1522	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [ <i>Kunhardtia radiata</i> ]	gi 4104575	86	4	6	6.13	52526	-	-	F E	P
1523	Prohibitin 2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508707647	380	8	32	9.43	32178	-	-	S	M V L P
1524	putative alcohol dehydrogenase [ <i>Hibiscus syriacus</i> ]	gi 6166483	81	2	4	6.56	42527	-	-	E	L
1525	heat shock protein 70B [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	gi 15219109	229	4	9	5.30	71270	-	-	N S P O	C P
1526	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein, putative isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508715524	306	8	5	7.84	150374	-	-	E	P
1527	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773941	269	8	26	7.03	36510	-	-	E	P C N

**Tabela 5B.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
1528	PLC-like phosphodiesterases superfamily protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508705833	72	1	6	7.96	36695	-	-	T	A
1529	Ethylene-forming enzyme [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508701444	64	3	11	5.44	35950	-	-	E S	L
1530	Proline iminopeptidase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508705382	198	4	18	6.02	45065	-	-	P	P C
1531	Peroxidase 68 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508787407	67	2	5	9.31	64269	-	-	O	A
1532	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2 isoform 2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508710773	488	12	38	8.51	36856	-	-	S O E	A P M N C L
1533	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508727703	526	11	36	5.38	37355	-	-	E	U
1534	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508710485	644	16	53	5.43	34130	-	-	M	U
1536	Putative uncharacterized protein	Tc08_g004600	96.61	2	5.8333	10.53	13808	-	-	U	U
1537	ATP synthase CF1 alpha subunit [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 313199688	1115	33	32	5.19	55336	-	-	N E	P M
1538	Ankyrin repeat domain-containing protein 2 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508707078	196	8	21	4.51	38670	-	-	P S	N C P L
1541	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508715552	181	3	9	8.77	62893	-	-	F E T S	A P N
1542	Peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 3 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508713478	270	5	8	7.96	49514	-	-	P E T	V P M N C
1543	Full=ATP synthase subunit beta, mitochondrial; Flags: Precursor	gi 231586	171	3	6	5.95	60335	-	-	N E O	L M N P
1544	Peroxidase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508724908	85	3	6	5.64	39488	-	-	O	V
1545	Tubulin alpha-5 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508785029	296	7	26	4.97	50370	-	-	N P	A C L
1547	Beta-hexosaminidase 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508726455	115	2	4	5.67	62592	-	-	E	C V
1549	Biotin carboxylase 1, chloroplastic isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508784914	186	4	11	6.90	59096	-	-	N E	P
1550	Tubulin alpha-5 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508785029	176	4	16	4.97	50370	-	-	N P	A C L
1551	hypothetical protein CICLE_v10027981mg [ <i>Citrus clementina</i> ]	gi 557526733	1003	19	25	5.11	71381	-	-	N P S	
1553	Serine carboxypeptidase S28 family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508699893	96	2	5	5.07	58394	-	-	P N	V P C
1554	hypothetical protein CICLE_v10015735mg [ <i>Citrus clementina</i> ]	gi 557548361	232	8	16	5.08	39822	-	-	E	U
1555	Target of Myb protein 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508718191	92	2	6	4.84	44872	-	-	E	C L N

**Tabela 5B.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
1556	GTP binding Elongation factor Tu family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508715870	187	5	11	8.99	63093	-	-	N	C
1557	GTP binding Elongation factor Tu family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508715870	386	10	21	8.99	63093	-	-	N	C
1558	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508698923	141	3	11	4.51	43078	-	-	P S E	N C
1560	Pyruvate kinase family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508727070	362	11	22	6.49	58289	-	-	E	L
1561	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508706453	190	4	8	8.12	63808	-	-	E	P M
1562	Putative uncharacterized protein	Tc08_g004600	100	3	17.5	10.53	13808	-	-	U	U
1564	Phosphoribulokinase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508778016	310	7	21	6.22	45827	-	-	N F S T E	P A
1565	NADP-isocitrate dehydrogenase [ <i>Citrus limon</i> ]	gi 5764653	99	2	5	6.49	46823	-	-	E S	A L
1567	Putative uncharacterized protein	Tc08_g004600	100	2	5.8333	10.53	13808	-	-	U	U
1568	hypothetical protein PRUPE_ppa002167mg [ <i>Prunus persica</i> ] essa ptn nao é exclusiva	gi 462400606	60	1	1	5.44	79726	-	-	E P	A P C M
1569	Aldolase-type TIM barrel family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508721809	85	3	9	9.34	40802	-	-	E	V N A C
1570	Putative uncharacterized protein	Tc08_g004600	100	2	5.8333	10.53	13808	-	-	U	U
1572	Hypothetical protein	Tc06_g005050	87.03	1	3.2864	4.4442	23777	-	-	N	U
1573	Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508725448	94	2	3	4.80	69029	-	-	E	C N L P
1574	Chloroplast heat shock protein 70 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508712739	1123	26	34	5.67	71583	-	-	P S	N M A P
1577	Photosystem II stability/assembly factor, chloroplast (HCF136) isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508707235	252	5	13	7.75	45257	-	-	E F	P
1578	Voltage dependent anion channel 2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508699781	693	17	42	8.88	29410	-	-	E S	M P L V
1579	Alcohol dehydrogenase 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508724716	833	21	46	6.56	42553	-	-	E	L
1581	Alcohol dehydrogenase 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508724716	869	21	68	6.56	42553	-	-	E	L
1582	hypothetical protein CICLE_v10000948mg [ <i>Citrus clementina</i> ]	gi 557537483	732	22	31	6.64	57669	-	-	O	P M

**Tabela 5B.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
1583	ATP synthase alpha/beta family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508708076	725	19	40	6.01	59857	-	-	N O	N P L M
1585	Sulfite reductase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508785436	593	15	23	9.23	78209	-	-	N E S	P N A
1586	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508783491	121	2	3	9.24	78911	-	-	N E	C
<b>Catongo 45 Days not inoculated - exclusive</b>											
1590	MLP-like protein 28 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508709120	293	9	41	5.30	17667	-	-	S	C P N
1592	ATP synthase CF1 alpha subunit [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 313199688	192	4	7	5.19	55336	-	-	E	P L M
1594	Plastocyanin 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508723249	119	3	41	4.79	16831	-	-	S E	P
1595	Photosystem II subunit O-2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508699354	70	3	8	5.85	35364	-	-	N S F	A P
1596	60S ribosomal protein L22 2	Tc04_g028320	100	13	68	9.9534	14042	-	-	E	C N L
1597	Uncharacterized protein At5g10860 mitochondrial	Tc01_g000040	100	13	45.0161	10.2131	34993	-	-	S E	M
1601	Photosystem I reaction center subunit IV A chloroplastic	Tc00_g041430	100	6	36.1702	9.9904	15078	-	-	F	P
1604	Ribosomal protein 5A [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508717740	109	3	18	9.82	23335	-	-	N	U
1606	Proteasome subunit beta type 6	Tc09_g000260	100	11	43.4043	5.0334	25393	-	-	PES	NCV
1607	N-terminal nucleophile aminohydrolases (Ntn hydrolases) superfamily protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508781876	108	2	13	5.20	25451	-	-	P S E	V C N
1609	Putative Chalcone flavonone isomerase	Tc10_g016290	99.96	8	64.3902	4.8658	22967	-	-	E	U
1612	RAN GTPase 3 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508783701	106	3	15	6.45	25385	-	-	N T	C
1613	20S proteasome alpha subunit G1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508785745	67	2	12	6.11	27611	-	-	PES	CVNLA
1614	Uncharacterized protein At2g37660 chloroplastic	Tc05_g004410	100	17	59.1592	9.6458	35993	-	-	E N S F	P A
1615	Protein ALUMINUM SENSITIVE 3	Tc05_g005540	96.18	1	5.6818	9.7692	28818	-	-	U	L
1616	Coatomer epsilon subunit isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508778345	64	2	13	5.25	32699	-	-	P E	L V C
1619	Esterase d, s-formylglutathione hydrolase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508717255	68	1	5	6.25	32165	-	-	E	C A
1621	Prohibitin 3 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508710774	126	2	11	9.35	30625	-	-	S E	N P L
1623	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508716491	122	2	11	6.13	29195	-	-	NES	C
1625	50S ribosomal protein L2 [Escherichia coli O157:H7 str. EDL933]	gi 15803844	73	4	10	10.93	29956	-	-	NE	U
1626	Photosystem II subunit O-2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508699354	215	7	23	5.85	35364	-	-	N S F	A P



**Tabela 5B.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
1627	Isoflavone reductase-like protein 4 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508722900	109	3	9	6.16	34864	-	-	U	U
1629	Prohibitin 2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508707647	210	6	31	9.43	32178	-	-	S	L
1630	Annexin 4, putative [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508728075	319	9	37	6.68	38535	-	-	E S	C L
1632	Putative Kynurenine formamidase	Tc02_g009350	99.79	7	27.8388	5.3674	30433	-	-	E	P
1633	Protochlorophyllide oxidoreductase A [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508720970	75	2	8	9.12	43365	-	-	E F	P
1634	Guanine nucleotide binding protein subunit beta like protein	Tc03_g007350	97.77	17	66.6667	7.1669	36111	-	-	E	P C
1636	Probable voltage gated potassium channel subunit beta	Tc04_g021750	99.95	14	35.061	7.108	36338	-	-	E	L
1637	Peroxidase 4	Tc10_g016040	99.92	6	23.3438	8.2828	34298	-	-	O	U
1638	Putative Alcohol dehydrogenase NADP	Tc05_g003870	100	15	53.3333	5.7006	34915	-	-	S E	P
1639	Class III peroxidase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508699742	64	2	7	9.01	36075	-	-	O	A
1640	Putative Aspartic proteinase nepenthesin 1	Tc03_g002580	100	9	22.1996	6.4609	52191	-	-	PS	A
1641	PfkB-like carbohydrate kinase family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508712952	81	2	7	5.26	35376	-	-	E	L
1643	Transcription factor Pur alpha 1	Tc09_g020230	100	20	65.9016	5.6933	32984	-	-	N	C N
1645	Photosystem II stability/assembly factor, chloroplast (HCF136) isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508707235	129	3	10	7.75	45257	-	-	N F	p
1648	Aldolase superfamily protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508716231	137	3	14	6.50	41322	-	-	S E	C N P L A
1649	Malate dehydrogenase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508780802	84	4	15	8.41	37270	-	-	S	M P A
1653	Adenosine kinase 2	Tc05_g006580	100	23	80.0587	5.0486	37317	-	-	E S	L A P
1654	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase like protein 3	Tc09_g010190	95.3	18	40.9692	8.504	49480	-	-	E	C M
1657	Peroxidase 4	Tc10_g016040	100	10	36.9085	8.2828	34298	-	-	O	U
1661	MLP-like protein 28	Tc02_g028660	99.88	4	34.6154	4.9211	17485	-	-	S	C P N
1663	Actin 7 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508700514	132	3	12	6.08	57488	-	-	E S P	P N C M
1664	Hypothetical protein	Tc00_g036850	99.99	7	4.7448	9.1948	160324	-	-	N	U
1665	S-adenosylmethionine synthetase 2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508714994	105	3	14	6.53	55069	-	-	E	C
1669	Alcohol dehydrogenase class P	Tc08_g012560	100	22	69.3717	6.5673	41627	-	-	E	L
1670	21 kDa seed protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773991	334	3	30	5.71	24264	-	-	SE	AL
1676	Putative uncharacterized protein	Tc08_g004600	81.97	2	10	10.53	13808	-	-	U	U
1677	Xylose isomerase	Tc00_g057480	100	19	41.2632	5.0468	53015	-	-	E	V L C

**Tabela 5B.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
1678	Phosphoglycerate kinase cytosolic	Tc07 g016590	100	22	77.3067	6.032	42335	-	-	E N S	N A L C P
1679	Biotin carboxylase 1, chloroplastic isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508784914	167	5	13	6.90	59096	-	-	S E	P
1680	Putative uncharacterized protein	Tc00 g075011	97.83	7	7.3011	8.4591	140172	-	-	N P	N
1682	Insulinase protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508783332	63	2	4	6.54	62907	-	-	S P	M P L
1683	Enolase	Tc05 g008230	100	24	71.6854	5.4802	47910	-	-	E	C
1685	Enolase	Tc03 g018600	100	23	66.0674	5.7658	47895	-	-	E	C
1686	ATP synthase alpha/beta family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508708076	895	30	43	6.01	59857	-	-	E N	P N M L
1689	21 kDa seed protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773991	86	3	15	5.71	24264	-	-	SE	AL
1690	Aldehyde dehydrogenase family 2 member B4 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773422	134	4	7	7.63	62275	-	-	E	P M
1693	putative miraculin-like protein 2 [ <i>Citrus hybrid cultivar</i> ]	gi 119367468	153	2	15	8.18	23610	-	-	SE	AL
1699	21 kDa seed protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773991	91	1	5	5.71	24264	-	-	SE	AL
1700	Aldehyde dehydrogenase family 2 member B4 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773422	179	8	15	7.63	62275	-	-	E	P M
1701	Chaperonin CPN60 2 mitochondrial	Tc00 g077920	100	28	48	5.4322	60875	-	-	P S N	C
1702	Putative uncharacterized protein	Tc08 g004600	94.57	2	11.6667	10.53	13808	-	-	U	U
1704	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase chloroplastic	Tc02 g009410	100	23	51	7.2816	63496	-	-	E	M P
1705	T-complex protein 1 subunit theta	Tc05 g028490	100	25	53.9162	5.4641	59179	-	-	E P N	C
1707	Putative uncharacterized protein	Tc08 g004600	98.05	2	10.8333	10.53	13808	-	-	U	U
1708	Putative retrotransposon protein identical	Tc03 g010050	100	3	3.3309	9.2496	153706	-	-	N P	N
1710	Non-specific phospholipase C3 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508718415	74	3	9	5.09	57908	-	-	S E	V L
1712	Catalytic, putative	Tc00 g082820	98.68	3	6.4789	9.4834	40012	-	-	E	P
1715	Phosphoglucomutase/phosphomannomutase family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508709149	78	3	8	5.40	63508	-	-	ES	C P N L A
1716	NADP-dependent malic enzyme	Tc09 g009030	99.96	19	34.687	6.4719	65057	-	-	E N P	C
1717	Heat shock 70 kDa protein mitochondrial	Tc09 g013630	100	29	45.6425	5.5629	72335	-	-	P N S O	M L P V
1718	Catalytic, putative	Tc00 g082820	95.11	1	1.9718	9.4834	40012	-	-	E	P
1723	L-ascorbate oxidase homolog	Tc08 g004490	100	13	28.8355	8.9216	59959	-	-	E	A L
1726	SKU5 similar 5 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508723283	130	4	10	8.90	60173	-	-	E	A
1732	Heatshock cognate protein 80	Tc07 g000670	99.89	30	41.0587	4.8159	79902	-	-	S P	C
1735	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	Tc05 g023750	100	24	37.6412	6.3697	87974	-	-	ES	ALPC

**Tabela 5B.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
1738	Subtilase family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508704232	122	3	7	9.25	82734	-	-	PS	U
1739	Photosystem II subunit O-2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508699354	223	7	21	5.85	35364	-	-	N S F	A P
1744	21 kDa seed protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773991	316	7	39	5.71	24264	-	-	SE	AL
1745	Putative uncharacterized protein	Tc08_g004600	96.18	1	5.8333	10.53	13808	-	-	U	U
1748	Subtilase family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508704232	328	8	18	9.25	82734	-	-	PS	U
1750	Lipoxygenase 2 chloroplastic	Tc09_g022580	93.93	23	29.8787	5.7308	103048	-	-	E	U
1752	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 328924791	441	13	19	6.04	53512	-	-	E	P
1753	Alcohol dehydrogenase 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508724716	75	2	5	6.56	42553	-	-	E	L
1764	Oxygen-evolvingenhancer protein 1 chloroplastic	Tc01_g003990	100	3	11.4458	5.6759	35107	-	-	ES N	A P
1765	Patellin-3, putative	Tc08_g015260	99.77	11	17.7316	4.591	69922	-	-	E	L
1778	GTP-binding nuclear protein Ran 3	Tc09_g010770	89.48	10	42.5339	6.4836	25042	-	-	I N	N C
1787	Putative GDP L fucose synthase 2	Tc09_g014300	100	11	34.6154	6.8906	37647	-	-	E	U
1792	N-carbamoylputrescine amidase	Tc00_g054440	88.23	4	14.2384	5.9253	33652	-	-	E	U
1794	Aldolase superfamily protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508716231	158	3	14	6.50	41322	-	-	S E	C N P L A
1797	Alcohol dehydrogenase 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508724716	517	18	54	6.56	42553	-	-	E	L
1802	Polyphenoxidase chloroplastic	Tc06_g016270	100	13	28.7603	5.9198	67391	-	-	E	P
1813	21 kDa seed protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773991	159	6	24	5.71	24264	-	-	SE	AL
1816	Acidic endochitinase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508776152	86	3	13	8.93	29262	-	-	S E	V
1821	SKU5 similar 5 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508723283	205	3	7	8.90	60173	-	-	E	A
1825	Heat shock cognate protein 70-1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508726275	69	1	1	5.03	71745	-	-	S P	C
1829	Subtilase family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508704232	302	6	10	9.25	82734	-	-	PS	U
1830	Chlorophyll a b binding protein 21 chloroplastic	Tc06_g013050	100	6	23.1034	4.8739	30978	-	-	F	P
1833	Probable fructokinase 4	Tc04_g019350	90.99	8	30.4878	5.0171	35196	-	-	E	L
<b>Catongo 45 Days - differential</b>											
548	Uncharacterized protein TCM_044674 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508727646	220	5	27	9.32	18315	UP	8.613	U	U
575	21 kDa seed protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773991	1099	41	60	5.71	24264	DOWN	5.567	SE	AL
576	Ribosomal protein L11 family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508715936	95	2	16	9.05	18023	UP	4.265	N	C
578	21 kDa seed protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773991	1018	45	60	5.71	24264	DOWN	6.331	SE	AL

**Tabela 5B.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
580	21 kDa seed protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773995	521	14	44	5.94	24263	DOWN	2.074		
583	Osmotin 34 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508777410	76	2	12	5.61	27063	UP	3.243	S	A
593	Quinone reductase family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508720763	93	2	19	6.21	21669	UP	1.856	E	L V
610	Photosystem II light harvesting complex gene 2.1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508701569	202	7	18	5.44	28689	-	1.317	-	-
618	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508780514	246	10	19	5.13	28219	-	1.327	-	-
622	ascorbate peroxidase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 194346220	224	8	44	5.52	27732	UP	1.854	O S	P L
646	Elongation factor 1 beta 1	Tc09_g025580	100	14	50.2262	4.5873	23904	UP	3.737	P S	C
649	Basic chitinase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508705603	90	2	10	5.23	35810	UP	2.327	S E T	V L
658	Glucan endo 1 3 beta glucosidase basic vacuolar isoform	Tc04_g029300	100	9	34.3243	5.9566	40030	UP	3.7	S	V
666	Cysteine synthase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508719254	353	10	33	5.22	34424	UP	2.115	E	N A L P C
684	Alcohol dehydrogenase 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508724716	106	4	19	6.56	42553	UP	1.595	E	C
700	21 kDa seed protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773991	254	10	32	5.71	24264	-	1.47	-	-
701	Peroxidase 4	Tc09_g034930	100	13	47.546	9.7549	35010	DOWN	7.302	E	A
732	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508710485	408	9	39	5.43	34130	UP	2.282	E	U
746	Larreatricin hydroxylase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508781072	515	14	18	6.23	67801		0.732		
759	Glutamine synthetase 1,4 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508707247	68	2	10	6.02	39269	UP	2.263	N E	C
780	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508723879	161	5	17	5.10	44453	DOWN	2.702	N E S	C
787	Aldolase-type TIM barrel family protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508707705	172	5	16	5.61	48136	UP	1.612	E	P M C
797	Alcohol dehydrogenase 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508724716	1178	43	69	6.56	42553	DOWN	19.46	E	L
798	Putative	Tc08_g004600	87.53	1	5.8333	10.53	13808	UP	3.013	U	U
802	Alcohol dehydrogenase 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508724716	1326	45	72	6.56	42553	DOWN	1.602	E	L
811	Citrate synthase family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508704881	173	5	12	8.38	52856	UP	1.603	E	M P
813	Peroxidase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508724908	150	3	9	5.64	39488	UP	1.73	O	V
819	Putative uncharacterized protein	Tc08_g004600	94.23	1	5.8333	10.53	13808	UP	2.985	U	U
836	Nucleus-like protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508711639	106	4	12	4.75	44758	DOWN	7.364	U	U
850	ribulose-bisphosphate carboxylase [ <i>Ceiba speciosa</i> ]	gi 4995113	694	20	33	6.14	52209	DOWN	2.461	EF	P

**Tabela 5B.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
862	Aldehyde dehydrogenase family 2 member B4 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773422	328	9	19	7.63	62275	-	1.448	-	-
868	Glucose-6-phosphate 1 dehydrogenase cytoplasmic isoform	Tc04 g002670	100	29	55.0584	5.9255	58613	UP	1.593	E	C
906	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508787184	592	11	20	5.06	64075	DOWN	1.647	PM	PLCA
908	Putative uncharacterized protein	Tc08 g004600	97.07	1	5.8333	10.53	13808	DOWN	5.193	U	U
935	NADP-dependent malic enzyme	Tc09 g009030	99.55	17	35.533	6.4719	65057	UP	2.009	E N P	C
941	Heat shock cognate protein 70-1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508786823	734	18	33	5.14	71494	-	1.329	-	-
943	NADP-dependent malic enzyme	Tc09 g009030	99.81	33	47.0389	6.4719	65057	DOWN	9.172	E N P	C
974	Hypothetical protein	Tc00 g058580	97.09	1	3.3088	9.6874	31339	DOWN	7.054	E	U
1016	Phospholipase D alpha 2 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508778540	490	16	26	5.47	92166	DOWN	1.609	T E	V C L P N M
<b>Catongo 72 Hours after inoculation - exclusive</b>											
937	Prohibitin 2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508707647	210	6	31	9.43	32178	-	-	E S	M V L P
938	Putative uncharacterized protein	Tc08 g004600	97.29	1	5.8333	10.53	13808	-	-	U	U
939	Alcohol dehydrogenase class P	Tc08 g012560	86.39	16	39.0052	6.5673	41627	-	-	E	C
942	Putative uncharacterized protein	Tc08 g004600	85.75	1	5.8333	10.53	13808	-	-	U	U
946	Rhamnose biosynthesis 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508701092	66	3	2	6.78	83060	-	-	E N	C
949	60S ribosomal protein L37a	Tc03 g023940	100	1	8.6957	10.6203	10250	-	-	E	M
954	Putative uncharacterized protein	Tc08 g004600	94.1	2	14.1667	10.53	13808	-	-	U	U
956	Putative uncharacterized protein	Tc08 g004600	99.42	2	10	10.53	13808	-	-	U	U
958	Catalytic, putative	Tc00 g082820	91.8	4	12.6761	9.4834	40012	-	-	E	P
959	Putative uncharacterized protein	Tc08 g004600	88.67	1	5.8333	10.53	13808	-	-	U	U
960	Putative uncharacterized protein	Tc00 g055540	91.52	1	5.6497	9.6813	20226	-	-	N	U
961	Putative uncharacterized protein	Tc08 g004600	96.64	1	5.8333	10.53	13808	-	-	U	U
963	Catalytic, putative	Tc00 g082820	100	2	4.2254	9.4834	40012	-	-	E	P
964	Putative Aspartate aminotransferase	Tc00 g023900	96.21	18	50	6.1176	43667	-	-	E	C
967	hypothetical protein CICLE_v10032502mg [ <i>Citrus clementina</i> ]	gi 557539279	119	4	17	8.97	28021	-	-	F N E S	P A
<b>Catongo 72 Hours not inoculated - exclusive</b>											
800	Cysteine synthase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508719254	227	7	25	5.22	34424	-	-	E	N A L P C
803	Serine/threonine-protein phosphatase PP2A catalytic subunit	Tc00 g029800	100	17	53.2051	4.9777	35634	-	-	E	C

**Tabela 5B.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pI	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
808	PfkB-like carbohydrate kinase family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508712952	277	6	25	5.26	35376	-	-	E	L
813	Putative Aspartate aminotransferase	Tc00_g023900	96.21	18	50	6.1176	43667	-	-	E	C
814	Larreatricin hydroxylase isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508781072	match	mat ch	match	6.23	67801	-	-	E	P
819	40s ribosomal protein SA [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508780104	117	4	15	5.04	34384	-	-	N S E	C P N L
820	Glutamine synthase clone R1, 1,ATGLN1,1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508711140	96	6	16	5.79	39613	-	-	E N	C
821	Putative uncharacterized protein	Tc08_g004600	96.64	1	5.8333	10.53	13808	-	-	U	U
827	Putative uncharacterized protein	Tc08_g004600	97.05	2	17.5	10.53	13808	-	-	U	U
832	S-adenosylmethionine synthetase 2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508714994	match	mat ch	match	6.53	55069	-	-	E	C
835	Catalytic, putative	Tc00_g082820	91.8	4	12.6761	9.4834	40012	-	-	U	U
837	21 kDa seed protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508773991	match	mat ch	match	5.71	24264	-	-	S E	A L
839	Regulatory particle triple-A ATPase 5A [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508719612	124	5	16	4.99	47743	-	-	P N T E	C N L
841	Aldolase-type TIM barrel family protein [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508782124	80	4	10	6.72	53106	-	-	N	C
845	Putative uncharacterized protein	Tc08_g004600	99.42	2	10	10.53	13808	-	-	U	U
853	Target of Myb protein 1 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508718191	match	mat ch	match	4.84	44872	-	-	E	C L N
865	Putative retrotransposon protein identical	Tc02_g019600	83.83	1	3.0516	9.4922	49341	-	-	N	N
869	Dynamain-like protein isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508777790	100	2	4	6.89	65400	-	-	N E P	P V L C
873	Putative uncharacterized protein	Tc08_g004600	99.97	2	5.8333	10.53	13808	-	-	U	U
884	Putative uncharacterized protein	Tc08_g004600	85.75	1	5.8333	10.53	13808	-	-	U	U
885	Malate dehydrogenase [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508774613	84	3	11	9.01	48446	-	-	E	P
892	Lipid binding protein putative	Tc04_g024040	90.84	1	3.7209	8.2154	21984	-	-	E	U
898	Putative uncharacterized protein	Tc08_g004600	97.29	1	5.8333	10.53	13808	-	-	U	U
916	Beta-glucosidase 44	Tc03_g004830	100	25	41.7154	9.5607	58555	-	-	E	U
922	Putative uncharacterized protein	Tc08_g004600	98.79	1	5.8333	10.53	13808	-	-	U	U
935	Ribosomal protein S27 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508701388	82	5	26	9.05	9950	-	-	E N P	C

**Tabela 5B.**Continuação

Spot ID	Identified Protein/Species	<sup>a</sup> Accession number	<sup>b</sup> Score	N <sup>o</sup> Pep	% Sequence Coverage	Theoretic al pl	Nominal mass (Mr)	UP/DO WN	Fold	<sup>c</sup> Biologic function	<sup>d</sup> Cellular localization
<b>Catongo 72 Hours -differential</b>											
212	Pyrophosphate--fructose 6 phosphate 1 phosphotransferase subunit alpha	Tc08 g008280	100	26	40.8428	6.993	67397	UP	1.57	E F N	U
224	Chloroplast heat shock protein 70 isoform 1 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508712739	100	3	6	5.67	71583	DOWN	11.11	P S N E	U
231	Malate dehydrogenase cytoplasmic	Tc04 g025530	99.97	3	8.9172	8.5834	33670	UP	3.354	E S	A V P N L C
247	Hypothetical protein	Tc10 g002350	99.55	2	8.9286	5.716	36815	UP	2.059	P	U
250	methionine synthase [ <i>Coffea arabica</i> ]	gi 6716760	89	3	13	5.69	24659	UP	1.598	E S	A P C L
251	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	Tc05 g023750	100	18	29.1092	6.3697	87974	UP	2.001	E S	A P C L
273	Sucrose synthase	Tc09 g006370	100	6	7.0352	5.9595	90561	UP	2.146	E	U
289	Putativeuncharacterized protein	Tc08 g004600	93.52	1	5.8333	10.53	13808	-	1.386	-	-
331	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2 isoform 2 [ <i>Theobroma cacao</i> ]	gi 508710773	639	15	43	8.51	36856	-	1.409	-	-

- a. Número de acesso: Números precedidos por “gi|” correspondem às identificações realizadas no banco de dados NCBIInr. Números precedidos por “Tc” correspondem às identificações realizadas diretamente no banco de dados do *Theobroma cacao*, via ProteinLynx.
- b. Para as identificações realizadas no banco de dados do *Theobroma cacao* o *score* é dado em forma de porcentagem de probabilidade. Para as identificações realizadas no NCBIInr, o *score* é baseado nos seguintes parâmetros: Ions *score* é de  $-10 \cdot \log(P)$ , onde P é a probabilidade de que o *match* observado seja um evento aleatório. *Scores* de íons > 55 indicam identidade ou extensiva homologia ( $p < 0.05$ ). Os *scores* da proteína são derivados dos *scores* dos íons como uma base não probabilística para o ranqueamento dos *hits* proteicos com mais identidade.
- c. Categorização de funções biológicas realizadas através do *software* Blast2Go: O, Estresse oxidativo; S, Defesa e estresse; F, Fotossíntese; E, Metabolismo e energia; T, Transdução de sinal; N, Metabolismo de ácidos nucleicos; P, Metabolismo de proteínas; U, Desconhecida.
- d. Categorização de localização celular realizada através do *software* Blast2Go: P, Cloroplasto; M, Mitochondria; C, Citoplasma; L, Membrana plasmática; N, Núcleo; V, Vacúolo; A, Apoplasto; U, Desconhecida.

## 5. DISCUSSÃO

As plantas em geral são acometidas por ataques de patógenos como, por exemplo, vírus, insetos e fungos que muitas vezes causam perdas importantes na economia agrícola. Assim torna-se importante o estudo das interações estabelecidas entre planta e patógeno com o objetivo de obter informações sobre os mecanismos moleculares envolvidos, principalmente os associados à resistência e patogenicidade.

A proteômica na área fitopatológica e genética da interação planta patógeno embora ainda não tenha chegado a sua “maturidade” se comparada a proteômica animal, tem crescido muito, e a ferramenta gel 2D ainda é muito utilizada com diversos trabalhos sendo publicados que usam modelos de resistência e suscetibilidade para identificar proteínas associadas a essas características (WANG *et al.*, 2012; BARILLI *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2013; MOURA *et al.*, 2014).

Neste trabalho a resposta metabólica em nível proteico foi acessada utilizando ferramentas proteômicas baseada em Eletroforese bidimensional (2-DE-bi-Dimensional-Electrophoresis) associada à espectrometria de massas, com o objetivo de compreender de forma global as alterações nos perfis proteicos observadas em dois geótipos de cacau (Catongo - suscetível e TSH 1188 – resistente), em resposta a inoculação controlada com basidiósporos de *M. perniciosa.*, obtendo assim uma visão geral das modificações nos padrões de acúmulo de proteínas expressas em ápices caulinares inoculados.

Uma série de modificações pode ser observada no comportamento de proteínas importantes envolvidas em diversas vias metabólicas já tradicionalmente associadas a interações bem como associadas à resistência, e em alguns casos especificamente de resposta a ataque de fungos. A discussão dos resultados encontrados nesse trabalho será apresentada com ênfase nas diferenças observadas em grupos funcionais selecionados através das análises de ontologia realizadas anteriormente.

Aqui consideramos as proteínas exclusivas do tratamento não inoculado como reprimadas (down acumuladas) durante a resposta a inoculação, por entender que seu acúmulo foi reduzido a abaixo do limite de detecção pelas análises realizadas. Da mesma forma as proteínas exclusivas dos tratamentos inoculados foram consideradas nas análises globais como up acumuladas.



### 5.1. Análise de perfil proteico de *spots* detectados

Como observado na Figura 7, as respostas entre o genótipo resistente e o suscetível quando desafiados com *M. perniciosa* são diferentes, principalmente quanto à quantidade de proteínas expressas. No entanto algumas similaridades foram observadas.

Ambos os genótipos em 72 horas apresentam menos *spots* detectados nos tratamentos inoculados em comparação com o não inoculado, indicando que este período aparenta ser caracterizado por maior inibição quanto à expressão global de proteínas. No entanto o aumento na acumulação de grupos de proteínas em relação a outros grupos menos representativos pode influenciar na detecção (O'FARRELL, 1975).

É de conhecimento geral que, no metabolismo de plantas desafiadas com estresse, principalmente o biótico, existe uma alocação de energia que é transferida para o desenvolvimento de respostas de defesa contra o patógeno. Geralmente é observada uma resposta metabólica mais acentuada nas primeiras horas até 48h, onde respostas cruciais principalmente do tipo oxidativa, que limita a colonização pelo patógeno, são desenvolvidas (ELSTNER, 1982; QUAN *et al.*, 2008). Para este patossistema já foi verificado a acumulação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas primeiras 72 horas em ápices caulinares infectados (DIAS *et al.*, 2011). Outro estudo utilizando extrato protéico de folhas do genótipo suscetível e resistente desafiados com *M. perniciosa* verificou que em 72 HAI ocorre pico de atividade de peroxidases para o genótipo resistente (CAMILLO *et al.*, 2013). Existe um custo fisiológico para o hospedeiro durante as respostas associadas à defesa (HORNS e HOOD, 2012; NEILSON *et al.*, 2013), e esse custo reflete no proteoma, inclusive por meio da diminuição dos gastos energéticos em vias metabólicas associadas a crescimento, desenvolvimento, modificação no perfil de detecção e acúmulo de proteínas, como observado em uma variedade resistente de morango inoculada com *Colletotrichum fragariae* (FANG *et al.*, 2012) que teve um aumento na detecção de *spots* nas primeiras horas e um decréscimo em 72 horas.

É interessante notar que no genótipo resistente, para o tratamento inoculado, foi observado um maior número de *spots* detectados tanto em 72 horas quanto em 45 dias apresentando respectivamente, 118 e 429 *spots* a mais do que o genótipo suscetível nas mesmas condições. Além disso, a maior inibição observada para os dois genótipos em 72 horas muda drasticamente no genótipo resistente em 45 dias, visto que, comparando o número

de proteínas expressas no tratamento inoculado com o não inoculado dentro desse genótipo foi observado um aumento de 273 *spots* detectados, enquanto que no genótipo suscetível foi observada uma diminuição de 165 *spots*, ou seja, Catongo de uma maneira geral apresenta o mesmo perfil de inibição proteica na presença de *M. perniciosus* ao menos nos dois tempos analisados (resultado fortemente associado ao fato do mesmo ser suscetível). Enquanto que TSH 1188 parece responder de forma diferente durante a infecção, e em 45 dias, parece ser caracterizada pela ativação de vias metabólicas.

Os diagramas de Venn observados na Figura 10 apresentaram os perfis de ocorrência dos *spots*. De forma interessante pode-se observar que comparando o genótipo suscetível com o resistente verifica-se que o primeiro apresentou, em todos os tempos, menos proteínas sendo expressas ou induzidas em resposta ao patógeno e mais proteínas exclusivas dos tratamentos não inoculados (reprimidas ou inibidas no tratamento inoculado) e esse perfil torna-se mais acentuado em 45 DAI. Não obstante esses resultados reforçam o que foi discutido anteriormente, pois Catongo apresenta muito mais proteínas sendo reprimidas (154) do que induzidas (34). O genótipo resistente, embora seja observado que em 72 HAI o número de proteínas inibidas (117) é maior que o de proteínas induzidas (55), ainda assim comparando-se ao suscetível verifica-se que o primeiro induz mais proteínas e tem menos proteínas reprimidas. E em 45 dias o nível de proteínas induzidas (376) aumenta drasticamente e o número de proteínas reprimidas (103) se mantém muito parecido ao encontrado em 72 HAI, mais uma vez reforçando a ideia de que TSH 1188, em 45 HAI, a resposta está associada à up regulação do arcabouço metabólico em geral, além claro, das respostas específicas que serão discutidas a *posteriori*. Esses resultados parecem diferir de forma geral dos resultados encontrados por da Hora Junior *et al.* (2012) que analisou o transcriptoma utilizando os mesmos genótipos desafiados com *M. perniciosus*, encontrando de forma geral mais genes diferencialmente expressos em Catongo do que em TSH 1188. No entanto, as respostas são em níveis metabólicos diferentes e nem sempre os resultados proteômicos corroboram os resultados genômicos ou transcriptômicos (GYGI *et al.*, 1999; ANDERSON e SEILHAMER, 1997; GREENBAUM *et al.*, 2003; JAWON SEO e KONG-JOO LEE, 2004; LAURENT *et al.*, 2010).

A análise de cluster a partir dos valores de acúmulo de proteínas pode ser realizada por uma série de métodos, incluindo a análise de PCA, que dentre outras funções serve para obter um agrupamento mais acurado das amostras e fornecer uma visão geral das variações mais

importantes.

Nossos resultados apresentaram padrões similares de abundância entre as triplicatas para cada tratamento como visto na Figura 8, confirmando a reprodutibilidade dos experimentos realizados. A Figura 9-A e B (PCA para genótipos individualmente) mostraram que em 72 horas a inoculação é o fator que mais influencia nas respostas em ambos os genótipos, onde podemos observar a separação evidente do tratamento inoculado e não inoculado, em 45 dias o perfil é mais parecido, pois os tratamentos agrupam mais próximos.

O fator “tempo” parece ser mais importante quando levamos em conta a separação entre os tratamentos. Essas observações são reforçadas se analisarmos mais profundamente a Figura 8, pois os tratamentos de mesmo tempo agrupam-se mais próximos, além disso, em 72 horas, como já dito, a inoculação tem uma influência maior do que o genótipo quanto ao agrupamento, visto que as os tratamentos inoculados agruparam independente do genótipo. Já em 45 dias o genótipo parece ser mais influente visto que os tratamentos estão agrupados quanto ao genótipo.

Foi realizada a análise de PCA de todos os tratamentos juntos, contudo as análises de PCA explicaram pouco (PCA 1 30 % e PCA 2, 16 %), mas se levamos em conta a diferença entre os dois genótipos já discutidas até aqui esse resultado pode ser esperado.

## **5.2. Proteínas de estresse oxidativo**

Espécies reativas de oxigênio (ROS) dentre elas, radical superóxido  $O_2^-$ , peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila  $(OH)^-$  eram conhecidas anteriormente apenas como moléculas com efeito tóxico para as plantas, que eram removidas por meio de enzimas antioxidativas. No entanto hoje sabemos que elas participam de várias funções celulares importantes, como, vias de sinalização, crescimento, e principalmente na resposta a estresse biótico e abiótico (SERRES e MITTLER 2006).

O estresse oxidativo é uma das repostas mais rápidas observadas em plantas para conter a presença e a disseminação de patógenos dentro do meio extracelular. Por serem tóxicas as ROS agem diretamente sobre os invasores, além disso, participam ativamente como moléculas que sinalizam respostas de defesa subsequentes (LA BLANCA, 2002). Porém ROS

são tóxicas tanto para os patógenos quanto para os tecidos infectados, sendo muito importante para a célula equilibrar a produção e a retirada dessas moléculas (SERRES e MITTLER 2006). Em 72 HAI o genótipo resistente apresentou a *up* acumulação de proteínas associadas a estresse oxidativo dentre elas Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase C2 isoforma 1 no *spot* 1123 e isoforma 2 *spot* 1122.

O gene codificando para a Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) foi predito como sendo potencialmente envolvido na interação do patossistema cacau x vassoura-de-bruxa por Gesteira *et al.* (2007). No entanto, não foi possível verificar sua expressão *diferencial in silico* entre o genótipo suscetível e resistente. Neste trabalho essa proteína apareceu como *up* acumulada ocorrendo no tratamento inoculado do genótipo resistente, podendo estar envolvida na interação. A GAPDH é uma proteína importante da via glicolítica, no entanto suas isoformas estão associadas com outras funções celulares importantes (DASTOOR e DREYER 2001). Recentemente foi verificado por Guo *et al.*, (2012) que GAPDH's atuam como transdutores de sinais ROS na resposta de *Arabidopsis* a estresse abiótico. GAPDH possuem sítios catalíticos de resíduos de cisteínas que podem ser oxidados por moléculas como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (HOLTGREFE *et al.*, 2008). Esses resultados indicam que a sinalização de respostas de defesas subsequentes podem estar sendo ativadas durante esse período.

Dias (2011) analisou a formação de peróxido de hidrogênio em tecidos de cacau infectados com *M. perniciosa* e verificou que o nível de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era significativamente alto nas primeiras 72 HAI no genótipo resistente, diferente do genótipo suscetível onde não havia variação, indicando resposta mais eficiente de TSH 1188 contra a infecção. Assim, a inibição verificada para a peroxidase da classe 3, peroxidase 4 (*spots* 1005, 1006) em 72 HAI, é requerida devido a necessidade de maiores concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> livre com o objetivo de conter a infecção. A proteína 2-cisteína peroxiredoxina (*spot* 1052) encontrada também é uma proteína que detoxifica peróxidos celulares (DIETZ *et al.*, 2002), sendo funcionalmente incluídas no grupo das peroxidases descritas anteriormente .

Em 45 dias foi observado que o genótipo resistente apresentou um número duas vezes maior de proteínas *up* acumuladas associadas a estresse oxidativo, do que o genótipo suscetível. Foi encontrado um número grande de proteínas associadas à detoxificação celular do excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Essa resposta diferencial de proteínas provavelmente está associada ao fato de que em 45 dias já está ocorrendo mudança de micélio biotrófico para saprofítico, pois

Sena *et al.* (2014) por análise histológica verificou a presença de hifas com grampos de conexão, característica de micélio na fase dicariótica. Esse micélio é caracterizado por crescimento intracelular e durante seu desenvolvimento leva a morte da célula e conseqüentemente do tecido. Provavelmente está sendo gerada uma explosão oxidativa em resposta a esse tipo micelial mais hostil visto que a indução de proteínas associadas a estresse foi altamente acumulada.

Ceita *et al.*, (2007) observaram que na variedade suscetível existe um aumento no nível de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos períodos avançados. Nossos resultados mostraram a *up* acumulação principalmente de peroxidases (*spots* 622, 813, 1544, 1531) em 45 DAI para esse genótipo. Dias *et al.* (2011) sugerem que o mesmo ocorre no genótipo resistente. A *up* regulação de peroxidases (*spots* 1421, 1432, 1490, 1141, 1132, 1129, 1401, 177, 1224, 1222, 1068) corrobora esses resultados. Contudo verificou-se que TSH 1188 possui mais proteínas detoxificantes sendo acumuladas, indicando que o estresse oxidativo nesse genótipo é maior e o mecanismo de detoxificação é mais eficiente. Verificamos também a *up* acumulação de superóxido dismutases, que são proteínas que catalisam a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio no genótipo resistente (*spots* 1168, 65 e 17), bem como a *down* acumulação em ambos os genótipos de isoformas de peroxidases, sendo TSH 1188 *spots* 1490, 1432 e 1421, Catongo *spots* 1639 1637 e 1657. Esses resultados indicam a complexa regulação entre produção e eliminação de ROS requerida durante a interação.

Foi verificado para ambos os genótipos *up* regulação de isoformas de GAPDH e uma Anexina 1, proteína já descrita por Clark *et al.* (2010) como participante da resposta a estresse oxidativo podendo ter função de peroxidase.

### **5.3. Metabolismo de carboidratos e fotossíntese**

Geralmente é observado que durante interação entre plantas e patógenos, principalmente quando desafiadas com microrganismos biotróficos, as mesmas apresentam respostas como diminuição de taxas fotossintéticas e mobilização de energia para a resposta ao ataque. Alguns autores já reportaram que durante a interação, para que a planta responda a infecção, é necessário um custo metabólico (SWARBRICK *et al.*, 2006; FANG *et al.*, 2012).

Logo, para que a planta mantenha a “produção” de respostas ao patógeno é necessário um aporte maior de assimilados. Esse aporte de energia, principalmente na forma de açúcar, em alguns casos atua como uma via de mão dupla, pois é útil para a planta bem como para o patógeno, que por sua vez tenta utilizar esse metabolismo para sua nutrição o que pode aumentar ainda mais a demanda dos mesmos (BERGER *et al.*, 2007). Por isso dada a complexidade da interação, é muito tênue a linha que separa o que de fato é uma resposta gerenciada pelo patógeno ou uma resposta da planta.

A *up* acumulação de proteínas do metabolismo de carboidratos observada em nosso patossistema, principalmente no genótipo resistente, indica o aumento da respiração que é requerida para que a planta metabolize carboidratos gerando energia, para que ela responda de forma mais eficiente a infecção, ou seja, com respostas mais rápidas na indução e ativação de mecanismos de defesa (BERGER *et al.*, 2007). Esse perfil já foi observado em outros patossistemas, como morango x *coletotricum fragariae* (FANG *et al.*, 2012), milho inoculado com vírus do mosaico da cana de açúcar (WU *et al.*, 2013) e também em estresse abiótico (ZADRAŽNIKA *et al.*, 2013).

Já foi descrito para este patossistema que os níveis de açúcares solúveis aumentam nos primeiros 14 dias de infecção, comparando-se plantas infectadas com plantas não infectadas da variedade comum de cacau (SCAPARI *et al.*, 2005). Também foi evidenciado a diminuição no nível de amido armazenado nas células com o desenvolvimento do micélio biotrófico. Além disso, o nível de amido no genótipo suscetível inoculado nos primeiros 15 dias de infecção foi maior do que no genótipo resistente, e em 45 DAI o nível de amido no genótipo resistente inoculado é maior que no suscetível (SENA *et al.*, 2014). Esses resultados corroboram os resultados encontrados neste trabalho, já que foi observada uma maior quantidade de proteínas diferencialmente expressas associadas ao metabolismo de carboidratos no genótipo resistente, indicando um maior consumo de amido que provavelmente é hidrolisado em hexoses justificando a menor quantidade de amido nesse genótipo nos períodos iniciais da doença.

Em 45 dias o fato de que o nível de amido em TSH 1188 inoculado tenha sido maior do que o de Catongo inoculado no trabalho de SENA *et al* (2014) não indica necessariamente que o metabolismo em Catongo esteja mais ativado. Na realidade o resultado encontrado no presente trabalho aponta que nesse período a maior parte das proteínas de metabolismo geral e de carboidratos estavam *down* acumuladas em Catongo. Talvez as observações feitas por

SENA *et al.* (2014) estejam associadas ao fato de que o metabolismo de uma forma geral em Catongo já está muito debilitado e provavelmente isso deve ter influenciado no metabolismo primário e secundário. Vale salientar que em ambos os genótipos existe um acúmulo de amido nas fases finais da interação, que provavelmente desempenham algum papel na transição de micélio biotrófico para saprofítico (ORCHARD e HARDWICK, 1988; MEINHARDT *et al.* 2006).

Foi observado um aumento inicial de proteínas associadas à fotossíntese para ambos os genótipos em 72 HAI. Resultados semelhantes a este foram encontrados por ZAMANY *et al.* (2012) durante a comparação de perfis proteômicos da interação compatível e incompatível entre *Pinus monticola* e *Cronartium ribicola*, onde foi observado que proteínas associadas a fotossíntese eram *up* acumuladas nos períodos iniciais da infecção. Esta ativação da fotossíntese pode beneficiar as células através do fornecimento de esqueletos de carbono e energia, que podem ser utilizados para respostas de defesas subsequentes (MAJOR *et al.* 2010).

Um alto nível de proteínas *up* acumuladas associadas ao metabolismo de açúcares foi verificado em 45 DAI. Esses açúcares não são apenas utilizados para a nutrição da planta e respostas de defesa, eles também podem atuar como sinalizadores, regulando a expressão gênica. O acúmulo de açúcares principalmente hexoses agem modulando negativamente genes associados à fotossíntese, embora hajam exceções, esse perfil é geralmente observado (BERGER *et al.*, 2007; FANG *et al.* 2012). Assim, isso pode explicar a *down* acumulação de proteínas associadas a fotossíntese, principalmente em 45 DAI para ambos os genótipos como observado na figura 15, A e B.

#### **5.4. Defesa e estresse**

Nota-se que, pela proporção de proteínas encontradas e seu perfil de expressão, TSH 1188 tem uma resposta de defesa mais robusta e eficiente que Catongo (Figuras 14- C e D; 15- C e D). Essa característica é demonstrada pela expressão de proteínas de defesa a fungos, como, Quitinase A (*spot* 1102) expressa em 72 HAI apenas nesse genótipo, e também em 45 DAI (*spot* 1097, 1135 e 1125).

Para genótipo suscetível essa classe de proteínas só foi detectada em 45 DAI. Duas isoformas de quitinases básicas (*spot* 649 fold change +2.3 e *spot* 1520) e uma endoquitinase ácida (*spot* 1816) *down* acumulada. A matriz da parede celular fúngica é composta de quitina, uma molécula essencial para o crescimento, desenvolvimento e patogenicidade. Embora as plantas não produzam quitina, elas possuem um vasto número de quitinases, que por sua vez tem como uma das suas principais funções, a degradação da parede celular de fungos em resposta a infecções (WAN e PENTECOST 2013). Variedades de plantas transgênicas expressando quitinases aumentaram sua resistência contra fungos e outros patógenos (ROBERT *et al.*, 2002 ; SHIN *et al.*, 2008; BEZIRGANOGLU *et al.*, 2013). Genes para essa classe de proteínas também foram encontrados por GESTEIRA *et al.* (2007) na biblioteca de cDNA da interação. Assim, a expressão nos períodos iniciais da infecção pode contribuir para a resistência em TSH 1188, pois a expressão de quitinases pode desempenhar papéis na defesa das plantas, tanto nos estágios iniciais quanto nos estágios tardios da infecção tendo sua expressão diferencialmente balanceada dependendo do nível constitutivo e de indução dessas enzimas (PUNJA AND ZHANG 1993). Assim presume-se que essas proteínas participam da defesa contra *M. perniciosa*, principalmente em 45 DAI onde a indução dessas proteínas é maior.

Durante o estresse as plantas ativam canais iônicos como observado no genótipo resistente também em 72 HAI (*spots* 381 e 389). Através desses canais, indutores bióticos como padrões moleculares associados à patógenos (PAMP`s), podem gerenciar sinalizações que iniciarão e regularão processos bioquímicos de defesa. A indução de canais iônicos através do reconhecimento pela planta de elicitores fúngicos já foram descritos (KOERS *et al.*, 2011), sugerindo que na variedade resistente esse mecanismo é ativado ao menos mais cedo do que na variedade suscetível.

O genótipo suscetível também expressa proteínas associadas a defesa em 72 HAI, embora a resposta de defesa seja de menor grau, considerando o número de proteínas *up* acumuladas. Assim foi verificado a *up* acumulação de metionina sintases (*spots* 250 e 251) proteínas que participam das etapas finais da síntese de metionina (CHU *et al.*, 1985) que além de ser um aminoácido essencial em todos os organismos, são substratos para síntese de poliaminas que desempenham papel importante na tolerância a estresse (SEAL *et al.*, 2013).

Foi verificado também para o genótipo suscetível a *up* acumulação de Proibitina (*spot* 937) que também foi identificada para o resistente (*spot* 1146). No entanto, apenas em 45



DAI. Essas proteínas dentre suas funções, regulam o nível de óxido nítrico, uma espécie reativa de nitrogênio que age gerenciando vias de sinalização associadas a estresse oxidativo em plantas (WANG *et al.*, 2010). As proibitinas foram incluídas na superfamília de proteínas chamadas por NADIMPALLI *et al.* (2000), por participarem da HIR (*hypersensitive induced reaction*) dentro da resistência a doenças e patógenos. O nível de transcritos para essa proteína aumenta em *Arabidopsis*, tanto em estresse biótico como abiótico (VAN AKEN *et al.*, 2010). No entanto, em 45 DAI embora uma isoforma desta proteína (*spot* 1523) tenha sido induzida no genótipo suscetível, outras duas isoformas foram *down* acumuladas (*spots* 1621, 1629).

Para o genótipo resistente em 72 HAI foi verificado a *down* acumulação de uma PR-2 (*spot* 1065). No entanto, em 45 DAI foram encontradas proteínas representantes de 4 famílias de PR's neste genótipo, como PR-4 (*spot* 1065), PR-5 que apresentaram *spots* bastante acumulados (*spot* 1072 1073 1060 1061) e PR-10 (*spot* 1036). No genótipo suscetível apenas dois *spots up* acumulados contendo uma PR-5 foram encontrados (*spots* 583 *fold change* +3.24 e *spot* 1515). PR's em plantas, formam um grupo heterogêneo de proteínas que possuem um nível basal de expressão em condições normais no tecido, no entanto são induzíveis durante a infecção por microorganismos patogênicos, embora possam estar envolvidas em outras atividades como processos de desenvolvimento tecidual (VAN LOON e VAN STRIEN 1999; VAN LOON *et al.*, 2006; SELS *et al.*, 2008), essas proteínas são classificadas em 17 grupos de PR-1 a PR-17 e foram agrupadas de acordo com sua ordem de descoberta por VAN LOON *et al.* (2006). Genes para PR's da família 4 foram encontrados na biblioteca de cDNA do genótipo resistente (GESTEIRA *et al.*, 2007). Osmotinas são proteínas multifuncionais também pertencentes à família das PR-5 e estão envolvidas em osmotolerância e possuem atividade antifúngica contra um amplo espectro de fungos patogênicos (HUSAINI e ABDIN, 2008; ABDIN *et al.*, 2011). Já foram descritas suas atividades na inibição da germinação de esporos *in vitro* de *Phytophthora infestans* e *Fusarium oxysporum*, inibição do crescimento de hifas em *P. infestans*, *P. nicotianae*, *Cercospora beticola*. Além disso, foi descrito em tomate, tabaco e morango transgênicos expressando essa proteína, aumentando a tolerância a estresse salino (Abada *et al.*, 1996; HUSAINI e ABDIN, 2008). Também foi identificada em outros patossistemas, sendo discutida a sua atuação aumentando a resistência de bananas transgênicas a *Fusarium oxysporum* sp e na resistência de batatas transgênicas a *Macrophomina phaseolina* e *Phytophthora infestans* (MAHDAVI *et al.*, 2012; ACHARYA *et al.*, 2013). Visto seu

potencial acima descrito, esta proteína pode ser objeto de estudo atuando como fonte de resistência na obtenção de variedades transgênicas de cacau para resistência a *M. perniciosa*.

PR`s da família 10 são proteínas descritas geralmente como ácidas de baixo peso molecular (essas características podem ser observadas na sua localização no gel de referência) e com atividades de ribonucleases (LEBEL *et al.*, 2010; He *et al.*, 2013). Genes para esta família podem estar sendo expressos constitutivamente ou induzidos durante o ataque de patógenos (VAN LOON *et al.*, 2006; LEBEL *et al.*, 2010). Genes para PR-10 apresentaram-se *up* acumulados em condições de estresse biótico e abiótico (ROBERT *et al.* 2001; JELLOULI *et al.* 2008), sendo uma das mais importantes proteínas dentre as PR`s, associadas a resposta a invasão de fungos (XIE *et al.*, 2010). A expressão desta proteína em meristema é algo novo na literatura, até então a expressão de genes para PR-10.5 estava descrita apenas ocorrendo em raízes e flores (LEBEL *et al.*, 2010). Outro ponto importante a ser discutido é que a ocorrência de sequência expressas para PR10 na biblioteca de cDNA da interação (GESTEIRA *et al.*, 2010) foram encontradas abundantemente apenas no genótipo suscetível, diferindo do resultado encontrado no presente trabalho.

Os inibidores de proteases são proteínas que inibem a atividade de enzimas proteolíticas, como, tripsinas, amilases quimiotripsinas (XAVIER-FILHO e CAMPOS, 1989). São amplamente difundidas no reino vegetal, geralmente possuem baixo peso molecular, e estão associados ao sistema natural defesa das plantas contra herbivoria (RYAN, 1990). No entanto, foram relatados associados à tolerância a estresse biótico e abiótico, além disso, servem como proteínas de reservas (RYAN, 1990; SRINIVASAN *et al.*, 2009).

No patossistema *T. cacao* x *M. perniciosa*, um inibidor de tripsina apresentou abundância de sequências na biblioteca de cDNA no genótipo resistente (TSH 1188) e não foram encontrados sequências expressas no genótipo suscetível (Catongo) (GESTEIRA *et al.*, 2007). Estudos posteriores feitos por Santos (2014), classificaram os inibidores presentes em cacau como do tipo kunitz. A grande quantidade de inibidores encontrados sendo expressos diferencialmente, está associada ao fato de que em cacau existem ao menos sete genes codificantes para esses inibidores (Santos, 2014) bem como, mecanismos de modificações pós traducionais podem influenciar na migração eletroforética das proteínas.

No presente trabalho foram encontrados inibidores de tripsina tanto no genótipo resistente como no suscetível, ambos apresentando isoformas com expressão diferencial tanto

em 72 HAI como em 45 DAI. Contudo, no genótipo suscetível em 45 DAI, os inibidores encontrados foram em sua maioria altamente *down* acumulados, embora tenham sido verificadas algumas isoformas *down* acumuladas no genótipo resistente, o nível de *down* acumulação foi menor e apenas nesse genótipo foi verificado a indução dessas proteínas. Sabe-se que fungos hemibiotróficos, inclusive o *M. perniciosus* em sua fase biotrófica, liberam enzimas líticas e proteases que contribuem para a patogenicidade do fungo (RINCONES *et al.*, 2008). Assim observamos que a indução de inibidores de proteases identificados devem estar associados à tentativa de inibir as hidrolases fúngicas, o que pode conferir maior resistência a este genótipo.

Foi observado para o genótipo suscetível em 72 HAI a *down* acumulação de HSP 70 (spot 224). Essas proteínas geralmente aumentam sua expressão em resposta a estresse, seja biótico ou abiótico, conferindo maior resistência celular a essa condição (DASTOOR e DREYER, 2000; SCARPECI *et al.*, 2008). As proteínas de choque térmico HSP 70 são uma família conservada de chaperonas moleculares citosólicas que participam de uma série de atividades celulares. No entanto, sua função principal se refere ao enovelamento correto de proteínas, sejam elas recém sintetizadas ou mal enoveladas. Além disso, atuam na translocação de proteínas secretadas via membrana, e também na prevenção contra a agregação de proteínas em suas formas não nativas (característica suportada apenas por essa família) e também na resposta a estresse (DASTOOR e DREYER, 2000; MAYER e BUKAU, 2005), estando associadas então tanto a respostas de defesa quanto metabolismo de proteínas. Assim presume-se que *down* acumulação observada esteja associada à suscetibilidade em Catongo comprometendo seu aparato protéico relacionado a metabolismo de proteínas.

Contudo, as HSP's podem apresentar expressão diferencial em patossistemas resistentes e suscetíveis e isoformas de uma mesma HSP podem responder de forma diferente a infecção. Essa característica foi observada por ZAMANY *et al.* (2012), durante a interação compatível e incompatível entre *Pinus monticola* e *Cronartium ribicola*, e no presente estudo, foi observado nos dois genótipos em ambos os tempos de inoculação, evidenciado pela *up* acumulação de representantes dessa família no genótipo resistente em 45 DAI, (*spot* 224 *fold change* + 7.3 *spot* 1284, 1321, 1040), e também no genótipo suscetível (*spots* 1551 e 1525), no entanto também foram verificados *spots down* acumulados para o genótipo suscetível (*spots* 1717, 1825 e 1732) assim o alto nível de *up* acumulação observada para o genótipo resistente indica maior resistência metabólica aos efeitos deletérios do estresse causados por

*M. perniciosa*.

### 5.5. Outras proteínas

Foi observado exclusivamente em TSH1188 em 72 horas, um grande aumento da Argininosuccinato sintase cloroplastica (*spot* 516, *fold change* +4.3), que é essencial para a produção de L-arginina. O acúmulo de arginina já foi observado em plantas submetidas a estresse (CAMARA *et al.*, 2000) e juntamente com o nitrito, são substratos para a síntese de óxido nítrico (NO) e poliaminas (YANG e GAO 2007). O NO esta associado a sinalização para a expressão metabólica de compostos associados a defesa da planta incluindo flavonóides e outros produtos do metabolismo secundário (KLESSIG *et al.*, 2000), além disso NO participa cooperativamente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na ativação de resposta HR durante interações incompatíveis (YOSHIOKA *et al.*, 2011).

Em 45 dias encontramos uma chalcona flavona isomerase (CFI) que apresentou *alta up* acumulação (*spot* 81 *fold change* +6.4) no genótipo resistente, no entanto no genótipo suscetível encontramos um *spot* (1609) correspondente a esta proteína sendo inibido. A CFI participa da síntese de flavonóides, que são de suma importância para interação entre plantas e microorganismos, tanto na interação hospedeiro-simbionte, como na indução de fitoalexinas (NORIMOTO *et al.*, 2003). Além disso, os flavonóides fornecem proteção contra estresse abiótico como radiações, herbivoria, atuam na retirada de espécies reativas de oxigênio e também desempenham papel importante na resistência contra ferrugem em cevada, através da inibição de celulases, xilenases e pectinases fúngicas (TREUTTER, 2005; SKADHAUGE *et al.*, 1997).

Durante esse trabalho foram encontradas algumas proteínas com função desconhecida, dentre elas encontram-se: *Pentatricopeptiderepeat containing protein* (PPR) At4g04790 mitochondrial (*spot* 1142), encontrada como *up* acumulada no genótipo resistente em 72 horas. Para essa proteína não foi encontrada função descrita quanto a ontologia realizada, no entanto as PPR`s já foram descritas como participantes de funções celulares diversas que incluem metabolismo de RNA organelares, biossíntese de organelas e também estresse (MEIERHOFF *et al.*, 2003; LURIN *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2009). Recentemente Laluk *et al.* (2011) verificou PPR sendo acumulada durante a resposta de Arabidopsis contra fungo necrotrófico e observou também que o gene responsável por essa proteína quando inativado causava suscetibilidade a infecção por fungos necrotróficos.

Modificações na acumulação de proteínas em outros grupos funcionais, como metabolismo de proteínas, ácidos nucleicos e transdução de sinal (Figura 14 e 15) também foram verificadas, indicando que a infecção por *M. pernicioso* influencia outras funções celulares em ambos os genótipos. A diferença principal observada é na *down* ou *up* regulação desses processos, e como já dito, TSH1188 apresentou uma maior quantidade de proteínas associadas a esses processos em ambos os tempos, indicando a sua maior eficiência metabólica durante a infecção. Isso pode ser observado principalmente na *up* regulação do aparato de *turnover* proteico, onde proteínas danificadas pelo estresse são degradadas no proteossoma liberando oligopeptídeos que podem ser utilizados para a síntese de novas proteínas. Assim, verificou-se a *up* regulação em 72 HAI da subunidade G1 do proteossoma 20S (*spot* 365), proteínas ribossomais (*spot* 1092), principalmente em 45 dias, onde esse processo torna-se mais intenso.

### **5.6. Proteínas fúngicas.**

As análises realizadas neste trabalho identificaram, três proteínas como sendo de origem fúngica e com similaridade para o fungo *Moniliophthora roreri*, que pertence ao mesmo gênero do *M. pernicioso*. As proteínas identificadas foram: 6-fosfogluconato desidrogenase (*spot*1304), que compõe a via glicolítica. Essa proteína foi diferencialmente expressa durante a interação do micélio dicariótico de *M. pernicioso* com fluido apoplástico (FA) de *T. cacao* (CAMILLO *et al.*, 2014). Uma proteína detoxificante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, catalase isozima p (*spot* 1259). Genes para essa proteína parecem desempenhar um papel adaptativo do fungo em relação à tolerância a ambientes estressantes, estresse oxidativo e virulência em *Beauveria bassiana* (WANG *et al.*, 2013) e também foi encontrada no trabalho de Camillo *et al.* (2014), sendo que os resultados encontrados pelos autores indicaram que o número de proteínas moduladas em resposta ao FA do genótipo resistente foi muito intenso do que com o FA do genótipo suscetível. Uma malato NAD-dependente (*spot* 1143) também foi encontrada. Todas essas proteínas ocorreram apenas no genótipo resistente como exclusivas do tratamento inoculado em 45 DAI. Esses dados ressaltam os mecanismos de defesa e adaptação do *M. pernicioso* ao ambiente adverso resultante das respostas de defesa de TSH 1188.

## **6. CONCLUSÃO**

- O perfil proteico do genótipo resistente durante a interação sugere que TSH 1188 apresenta um nível maior de estresse oxidativo em 72 HAI e principalmente em 45 DAI, e também possui mais mecanismos de tolerância a esse estresse se comparado suscetível.
- O perfil de acúmulo de peroxidases foi diferente entre os tempos estudados indicando a regulação diferencial de respostas associadas a estresse oxidativo.
- O genótipo resistente apresentou mais proteínas sendo expressas bem como uma variedade maior de proteínas associadas à defesa e estresse, enquanto o genótipo suscetível apresentou mais proteínas sendo reprimidas durante a interação e principalmente em 45 DAI, o que indica que as respostas em TSH 1188 são mais eficientes tanto quantitativamente quanto qualitativamente.
- Proteínas da família das PR's parecem desempenhar um papel importante na resistência de TSH 1188, principalmente os representantes das PR-5 que apresentaram um grande número de *spots* sendo expressos. Essas proteínas podem ser objeto de estudos posteriores devido ao seu potencial na defesa contra fungos fitopatogênicos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADA, L. R.; D'URZOA, M. P.; LIUA, D.; *et al.* Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. **Plant Science**, v. 118, n. 1, p. 11–23, 1996.

ABDIN, M. Z.; KIRAN, U.; ALAM, A. Analysis of osmotin, a PR protein as metabolic modulator in plants. **Bioinformation**, v. 22;5, n. 8, p. 336-340, 2011.

ACHARYA, K.; PAL, A. K.; GULATI, A.; *et al.* Overexpression of *Camellia sinensis* thaumatin-like protein, CsTLP in potato confers enhanced resistance to *Macrophomina phaseolina* and *Phytophthora infestans* infection. **Molecular Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 609-622, 2013.

AGRIOS, G. N. Plant pathology. San Diego: Academic Press, 1997.

AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v.97, n. 5, p. 1012-22, 2005.

ALMAGRO, L.; GÓMEZ-ROS, L. V.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; ROS-BARCELO, A.; PEDREÑO, M. A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 377-390, 2009.

ALMEIDA, D. M. **Identificação de proteínas do filoplano do *Theobroma cacao* L.** 2010. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.

ALMEIDA, H. A.; LUZ, E. D. M. N. Influência da chuva, temperatura e umidade relativa do ar na produção de basidiomas de *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 374, 1995.

ALVERSON, W. S.; WHITLOCK, B. A.; NYFFELER, R.; *et al.* Phylogeny of the core Malvales: evidence from ndhF sequence data. **American Journal of Botany**, v. 86, n. 10, p.1474–1486, 1999.

ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L: Diversification of catalytic activities and ligand interactions in the protein fold shared by the sugar isomerases, eIF2B, DeoR transcription factors, acyl-CoA transferases and methenyltetrahydrofolate synthetase. **Journal of Molecular Biology.**, v. 356, p.823-842, 2006.

ANDERSON, L.; SEILHAMER, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. **Electrophoresis**, v. 18, n. 3-4, p. 533-537, 1997.

ARENKOV, P.; KUKHTIN, A.; GEMMELL, A.; VOLOSHCHUK, S.; CHUPEEVA, V.; MIRZABEKOV, A. Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions. **Analytical Biochemistry**, v.15;278 (2), p.123-31, 2000.

ARGOUT, X. *et al.* The Genome of *Theobroma cacao*. **Nature Genetics** (Print), v. 43, p. 101-108, 2011.

ARGOUT, X. *et al.* Towards the understanding of the cocoa transcriptome: Production and analysis of an exhaustive dataset of ESTs of *Theobroma cacao* L. generated from various tissues and under various conditions. **BMC Genomics**, v. 9, p. 512, 2008.

ARTAL-SANZ, M.; TAVERNARAKIS, N. Prohibitin and mitochondrial biology. **Trends in Endocrinology & Metabolism.**, v. 20, p. 394–401, 2009.

ASGHARI, R.; EBRAHIMZADEH, H. Drought stress increases the expression of wheat leaf ribulose- 1, 5- bisphosphate carboxylase/oxygenase protein. **Iranian Journal of Science & Technology**, v. 30, n. A1, 2006.

BAILEY- SERRES, J.; MITTLER, S. R. The Roles of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. **Plant Physiology**, v. 141, p. 311, 2006.

BAKER, R. E. D.; HOLLIDAY, P. Witches broom disease of cacao (*Marasmius perniciosus* Stahel). Commonwealth Mycological Institute, Richmond. **Phytopathology Paper**, v.2, p. 42, 1957.

BAKER, R. E. D.; CROWDY, S. H. Studies in the witches broom disease of cacao caused by *Marasmius perniciosus* Stahel. Part I. Introduction, symptoms and etiology. **Trinidad: Imperial College of Tropical Agriculture**, v. 7, p. 78, 1943.



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

BARILLI, E.; RUBIALES, D.; CASTILLEJOA, M. Á. Comparative proteomic analysis of BTH and BABA-induced resistance in pea (*Pisum sativum*) toward infection with pea rust (*Uromyces pisi*). **JOURNAL OF PROTEOMICS**, v. 75, p. 5189 – 5205, 2012.

BARROS, F. C; SAGATA, E.; FERREIRA, L. C. C.; JULIATTI, F. C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p.231-239, 2010.

BASTOS, C. N. Epifitologia, hospedeiros e controle da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa* (stahel) Singer ). Ilhéus, Bahia: CEPLAC/CEPEC. **Boletim Técnico**, n. 168, p. 21, 1990.

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

BERTOLDE, F. Z. **Respostas fisiológicas ao alagamento do substrato e diversidade genética molecular de clones de *Theobroma cacao***. 2011 Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2011.

BEZIRGANOGLU, I.; SHAW-YHI HWANG ;• FANG, T. J.; *et al.* Transgenic lines of melon (*Cucumis melo* L. var. makuwa cv. ‘Silver Light’) expressing antifungal protein and chitinase genes exhibit enhanced resistance to fungal pathogens. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 112, p. 227–237, 2012.

BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas, 2005. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; *et al* (Ed.) **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba/ SP, FEALQ, p.11-28, 2005

BONFING, K. B.; SCHREIBER, U.; GABLER, A.; *et al.* Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. **Planta**, v. 225, n. 1, p. 1-12, 2006.

BROWN, J. S.; SCHNELL, R. J.; MOTAMAYOR, J. C.; LOPES, U.; KUHN, D. N.; BORRONE, J. W. Resistance gene mapping for witches`broom disease in *Theobroma cacao*

L. in an F2 population using SSR markers and candidate genes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.130, n.3, p.366-373, 2005.

CAMARA, T. R.; WILLADINO, L.; TORNÉ, J. M.; *et al.* Efeito do estresse salino e da prolina exógena em calos de milho. **Revista. Brasileira. Fisiologia. Vegetal.**, v.12, n. 2, 2000.

CAMILLO, L.R. Tc-cAPX, a cytosolic ascorbate peroxidase of *Theobroma cacao* L. engaged in the interaction with *Moniliophthora perniciosa*, the causing agent of witches' broom disease. **Plant Physiology and Biochemistry** v. 73, p. 254–265,2013.

CAPRIOLI, R. M.; FARMER, T. B.; GILE, J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. **Anal Chem**, v. 69, n. 23, p. 4751–4760, 1997.

CARBERRY, S.; NEVILLE, C. M.; KAVANAGH, K. A.; DOYLE, S. Analysis of major intracellular proteins of *Aspergillus fumigatus* by MALDI mass spectrometry: identification and characterisation of an elongation factor 1B protein with glutathione transferase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications.**, v. 341, p.1096-1104, 2006.

CEITA, G. O.; MACÊDO, J. N. A.; SANTOS, T. B.; *et al.* Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant science**, v.173, n.2, p. 106-117, 2007.

CHAURAND, P.; SANDERS, M. E.; JENSEN, R. A.; CAPRIOLI, R. M. Proteomics in diagnostic pathology: profiling and imaging proteins directly in tissue sections. **The American Journal of Pathology**, v. 165, n. 4, p. 1057-1068, 2004.

CHIVASA, S.; HAMILTON, J. M.; PRINGLE, R. S., *et al.*, Proteomic analysis of differentially expressed proteins in fungal elicitor-treated *Arabidopsis* cell cultures, **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 7, p. 1553-1562, 2006.

CHU, J.; SHOEMAN, R.; HART, J.; *et al.* Cloning and expression of the metE gene in *Escherichia coli*. **Arch Biochem Biophys.**, v. 239, n. 2, p. 467-74, 1985.

CLARK, G.; KONOPKA-POSTUPOLSKA, D.; HENNIG, J.; *et al.* Is annexin 1 a multifunctional protein during stress responses? **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 3, p. 303-307, 2010.

CORDEIRO, M. C. R.; SÁ, M. de F.G. Biotecnologia e resistência a patógenos. Biotecnologia **Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, n. 10, p. 34-39, 1999.

COSIO, C.; DUNAND, C. Specific functions of individual class III peroxidase genes. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p. 391–408, 2008.

DASTOOR, Z.; DREYER, J. Nuclear translocation and aggregate formation of heat shock cognate protein 70 (Hsc70) in oxidative stress and apoptosis **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 2845-2854, 2000.

DIAS, C. V.; MENDES, J. S.; DOS SANTOS, A. C.; *et al.* Hydrogen peroxide formation in cacao tissues infected by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 1-6, 2011.

DICKSTEIN, E. R.; PURDY, L. H.; FRIAS, G. A. *Crinipellis perniciosa*, the cacao witches' broom fungus: Inoculum production and storage, **Phytopathology**, v. 77, p. 1747, 1987.

DIETZ, K. J.; HORLING, F.; KÖNIG, J. ; *et al.* The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. **journal of experimental botany**. v 53, n. 372, p.1321- 1329, 2002.

DONG, X. The role of membrane-bound ankyrin-repeat protein *acd6* in programmed cell death and plant defense. **Science's STKE**, 6p., 2004.

DOUBNEROVÁ, H. V.; MIEDZIŃSKA L.; DOBRÁ J.; *et al.* Phosphoenolpyruvate carboxylase, NADP-malic enzyme, and pyruvate, phosphate dikinase are involved in the acclimation of *Nicotiana tabacum* L. to drought stress. **Journal of Plant Physiology**., v. 171, n. 5, p. 19-25. 2014

ELSTNER, E. F. Oxygen activation and oxygen toxicity. **Annual Review of plant Physiology**, v. 33, p. 73-96, 1982.

EUBEL, H.; MEYER, E. H.; TAYLOR, N. L, *et al.* Novel proteins, putative membrane transporters, and an integrated metabolic network are revealed by quantitative proteomic

analysis of Arabidopsis cell culture peroxisomes. **Plant Physiology**, v. 148, n.4, p.1809-1029, 2008.

LU, H. *et al.* ACD6, a Novel Ankyrin Protein, Is a Regulator and an Effector of Salicylic Acid Signaling in the Arabidopsis Defense Response. **The Plant Cell**, Vol. 15, 2408–2420, 2003.

EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, Causal Agent of Witches' Broom Disease of Cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, n. 3, p. 515-523, 1980.

EVANS, H.C. Witches broom disease: a case study. **Cocoa Growers Bulletin**, n.32, p. 5-19, 1981.

LEAL JR, <sup>1</sup>G. A.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; FIGUEIRA, A. Genes differentially expressed in *Theobroma cacao* associated with resistance to witches' broom disease caused by *Crinipellis pernicioso*. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p. 279–292, 2007.

FALEIRO, F. G.; QUEIROZ, V. T.; LOPES, U. V., *et al.* Mapping QTLs for Witches'Broom (*Crinipellis pernicioso*) Resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.) .**Euphytica**, v. 149, p. 227-235, 2006.

FERRAZ, E. C. de A. A vassoura-de-bruxa na Bahia: plano integrado de ações. Ilhéus, **CEPLAC**. 43 p., 1989

FLEISCHMANN, R. D.; ADAMS, M. D.; WHITE, O., *et al.* Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, v. 269, n. 5223, p. 496-512, 1995.

FUTCHER, B.; LATTE, G. I.; MONARDO, P.; *et al.* A sampling of the yeast proteome. **Molecular Cell Biology**, v. 19, p. 7357-7368, 1999

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

GESTEIRA, A. S., *et al.* Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cocoa tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis perniciosa*. **BioTechniques**. v. 35, n.3, p. 494-500, 2003.

GRAMACHO, I. C. P.; MANDARINO, E. P.; MATOS, S. A. Cultivo e beneficiamento do cacau na Bahia. Itabuna: **CEPLAC**, 125 p., 1992.

GREENBAUM, D.; COLANGELO, C.; WILLIAMS, K; *et al.* Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. **Genome Biology**, v. 4, p.117, 2003.

GUO, A. B.; SHIVAKUMAR, P.; DEVAIAH, A. B.; *et al.* Cytosolic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenases Interact with Phospholipase Dd to Transduce Hydrogen Peroxide Signals in the Arabidopsis Response to Stress. **The Plant Cell**, v. 24, p. 2200–2212, 2012.

GYGI, S. P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B. R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular Cell Biology**, v, 19, p. 1720-1730, 1999.

HAMMOND –KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, v. 8, p. 1773–1791, 1996.

HE, M.; XU, Y.; CAO, J.; *et al.* Subcellular localization and functional analyses of a PR10 protein gene from *Vitis pseudoreticulata* in response to *Plasmopara viticola* infection. **Protoplasma**. v. 250, n. 1, p. 129-140, 2013.

HOLLIDAY, P. Witches broom disease of cacao (*Marasmius pernicius* Stahel). **London: H. M. Stationery Office**, 8p. 1952.

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

HORNS, F.; HOOD, M. E. The evolution of disease resistance and tolerance in spatially structured populations. **Ecology and Evolution**, v. 2, n. 7, p. 1705–1711, 2012

HOUTERMAN, P. M.; SPEIJER, D.; DEKKER, H.; *et al.* The mixed xylem SAP proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. **Molecular Plant Pathology** v.8, p. 215-221, 2007.

HUSAINI, A. M.; ABDIN, M. Z. Overexpression of tobacco osmotin gene leads to salt stress tolerance in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) plants. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 4, 2008.

**INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION (ICCO)**. Boletim Trimestral de 2013 Estatísticas do Cacau. Disponível em:<<http://www.icco.org/>>. Acesso em: 14 de maio de 2014

JAKMAN, J. E.; GRAYHACK, E. J.; PHIZICKY, E. M. The use of *Saccharomyces cerevisiae* proteomic libraries to identify RNA modifying proteins. **Methods of Molecular Biology**, v.93, p.488-383, 2008.

SELS, J.; MATHYS, J.; DE CONINCK, B. M. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 941–950, 2008.

JELLOULI, N.; BEN JOUIRA, H., SKOURI, H.; *et al.* Proteomic analysis of Tunisian grapevine cultivar Razegui under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 5, p. 471–481, 2008.

JONES, A. M. E.; TOMAS, V.; BENNETT, M. H.;*et al.* Modifications to the Arabidopsis Defense Proteome Occur Prior to Significant Transcriptional Change in Response to Inoculation with *Pseudomonas syringae*.**Plant Physiology**, v. 142, p. 1603–1620, 2006.

JONES, P. G.; ALLAWAY, D.; GILMOUR, D. M.; *et al.* Gene discovery and microarray analysis of cacao (*Theobroma cacao* L.) varieties. **Planta**, v. 216, p. 255-264, 2002.

JUNGBLUT, P.; WITTMANN-LIEBOLD, B. Protein analysis on a genomic scale. **J Biotechnol**, v. 41, p.111-120, 1995.

KALIFA, Y.; GILAD, A.; KONRAD, Z.; *et al.* The water- and salt-stress-regulated *Asr1* (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. **Biochemistry. J.**, v. 381, p. 373–378, 2004.

KAWAMOTO, R. M.; CASWELL, A. H. Autophosphorylation of glyceraldehydephosphate dehydrogenase and phosphorylation of protein from skeletal muscle microsomes. **Biochemistry**, v. 25, p. 657-661, 1986.

KLESSIG, D. F.; DURNER, J.; NOAD, R.; *et al.*, Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. **PNAS**, v. 97, n. 16, p. 8849–8855, 2000.

KOERS, S.; GUZEL-DEGER, A.; MARTEN, I.; *et al.* Barley mildew and its elicitor chitosan promote closed stomata by stimulating guard-cell S-type anion channels. **The Plant Journal**, v.68, n.4, p. 670-680, 2011.

KRUPASAGAR, V.; SEQUEIRA, L. Auxin destruction by *Marasmius perniciosus* **American Journal Botany**, v.56, p. 390-397, 1969.

LALUK, K.; ABUQAMAR, S.; MENGISTE, T. The Arabidopsis Mitochondria-Localized Pentatricopeptide Repeat Protein PGN Functions in Defense against Necrotrophic Fungi and Abiotic Stress Tolerance. **Plant Physiology**, v. 156, p. 2053–2068, 2011.

LAN, P.; LI, W.; SCHMIDT, W. Complementary proteome and transcriptome profiling in phosphate-deficient arabidopsis roots reveals multiple levels of gene regulation. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 10, p. 1156–1166, 2012.

LAURENT, J. M.; VOGEL1, C.; KWON1, T.; *et al.* Protein abundances are more conserved than mRNA abundances across diverse taxa. **Proteomics**, v. 10, p. 4209–4242, 2010.

LAWRENCE, J. S.; CAMPELO, A. M. F. L. Enfermidades do cacauero: doenças fúngicas que ocorrem nas folhas, ramos e tronco. **Agrotrópica**, v. 3, p. 1-14, 1991.

LEAL, J. B. ; SANTOS, L. M.; SANTOS, C. A. P.; *et al.* Diversidade genética de acessos de cacau de fazendas e de banco de germoplasma na Bahia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (Online), v. 43, p. 851-858, 2008.

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

LEBEL, S.; SCHELLENBAUM, P.; WALTER, B.; MAILLOT, P. Characterisation of the *Vitis vinifera* PR10 multigene family Sylvain Lebe. **BMC Plant Biology**, v. 10, n.184, 2010.

LEMOS, L. S. L. ; GRAMACHO, K. P. ; SANTOS, R. M. F.; *et al.* Identificação de SNPS na população F2 SCA6 X ICS1 para obtenção de marcas associadas à resistência do cacauero a vassoura-de-bruxa. In: 56º CONGRESSO BRASILEIRO de GENÉTICA, 2010, Guarujá. 56º CONGRESSO BRASILEIRO de GENÉTICA, 2010.

LIMA, L. S. ; GRAMACHO, K. P. ; GESTEIRA, A. S.; *et al.* Characterization of microsatellites from cacao *Moniliophthora perniciosa* interaction expressed sequence tags. **Molecular Breeding**, v. 22, p. 315-318, 2008.

LIMA, L. S.; GRAMACHO, K. P.; CARELS, N.; *et al.* Single nucleotide polymorphisms from *Theobroma cacao* expressed sequence tags associated with witches broom disease in cacao. **Genetics and Molecular Research** (Online), v.8, p. 799-808, 2009.

LIMA, L. S.; GRAMACHO, K. P.; PIRES, J. L.; *et al.* Development, characterization, validation, and mapping of SSRs derived from *Theobroma cacao* L. *Moniliophthora perniciosa* interaction ESTs. **Tree Genetics & Genomes** (Print), v. 6, p. 663-676, 2010.

HEINS, L.; MENTZEL H.; SCHMID, A. Biochemical, Molecular, and Functional Characterization of Porin Isoforms from Potato Mitochondria. **The journal of biological chemistry**, v. 269, n. 42, p. 26402-26410, 1994

LOPES, U. V.; MONTEIRO, W. R.; PIRES, J. L.; *et al.* Cacao Breeding in Bahia, Brazil Strategies and Results. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 51, p. 73-81, 2011.

LURIN, C.; ANDRÉS, C.; AUBOURG, S. *et al.* Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. **The Plant Cell**, v. 16, p. 2089-2103, 2004.

LUZ, E. D. M. N.; ALMEIDA, H. A.; MACHADO, R. C. R. Períodos de incubação, secamento de vassouras, produção de basidiomas e atividade de *Crinipellis perniciosa* em ramos e frutos de cacauero na Bahia. In: XXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Itajaí. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p. 341-341, 1994.

LYTLE, B. L.; SONG, J.; DE LA CRUZ, N. B. Structures of Two *Arabidopsis thaliana* Major Latex Proteins Represent Novel Helix-Grip. **Folds Proteins**, v. 76, n. 1, p. 237-243, 2009.



MAHDAVI, F.; SARIAH, M.; MAZIAH, M. Expression of rice thaumatin-like protein gene in transgenic banana plants enhances resistance to fusarium wilt. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 4, p.1008-1019, 2012.

MAJOR, I. T.; NICOLE, M. C.; DUPLESSIS, S.; SEGUIN, A. Photosynthetic and respiratory changes in leaves of poplar elicited by rust infection. **Photosynthesis Research**, v. 104, p. 41–48, 2010.

MARINGONI, A.C. Caracterização de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e avaliação da resistência de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-*curtobacterium*. 2000. 73f. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2000.

MATTHEWS, R. E .F. Plant Virology San Diego: Academic Press, p.100, 2002.

MAYER M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cell Mol Life Sci** ., v. 62, p. 670–684, 2005.

MENDES, J S. **Análises proteômicas da formação de cristais de oxalato de cálcio em Theobroma**. 2010. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.

MEYER, Y *et al.* Preparation by two-dimensional electrophoresis of proteins for antibody production: Antibodies against proteins whose synthesis is reduced by auxin in tobacco mesophyll protoplasts **Electrophoresis**: v.9, n. 11, p.704-712, 1988.

MICHELI, F.; GUILTINAN, M.; GRAMACHO, K. P.; *et al.* Functional Genomics of Cacao. **Advances in Botanical Research**, v. 55, p. 128-163, 2010.

MISHRA, S.; MURPHY, L. C.; MURPHY, L. J. The prohibitins: Emerging roles in diverse functions. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**., v.10, p. 353–363, 2006.

MOHAMED, H. AL-WHAIBI. Plant heat-shock proteins: A mini review. **Journal of King Saud University – Science**, v. 23, p. 139–150, 2011.

MONDEGO, J. M. C.; CARAZZOLLE, M. F.; COSTA, G. G. L. ; *et al.*, A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. **BMC Genomics**, v. 9, p. 548, 2008.

MOTAMAYOR, J. C.; LANCHENAUD, P.; WALLACE da SILVA, M. J. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). **PloS ONE**, v.3, n. 10, p. 33-11, 2008.

MOURA, H. F. N.; VASCONCELOS, I. M.; SOUZA, C. E. A. Proteomics changes during the incompatible interaction between cowpea and *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz and Sacc. **Plant Science**, v. 217-218 , p. 158– 175, 2014.

NADIMPALLI, R.; YALPANI, N.; JOHAL, G. S.; *et al.* Prohibitins, stomatins, and plant disease response genes compose a protein superfamily that controls cell proliferation, ion channel regulation, and death. **The Journal of Biological Chemistry.**, v. 275, p. 29579–29586, 2000.

NEILSON, E. H.; GOODGER, J. Q. D.; WOODROW, I. E.; *et al.* Plant chemical defense: at what cost?. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 5, 2013.

NEUHOFF, V. *et al.* Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255-262, 1988.

NIMCHUK, Z.; EULGEM, T.; *et al.* Recognition and response in the plant immune system. **Annual Review of Genetic**, v.37, p. 579 -609, 2003.

O'FARRELL, P. H. J. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry** . 250, 4007 (1975).

ORCHARD, J. E.; HARDWICK, K. Photosynthesis, carbohydrate translocation and metabolism of host and fungal tissues in cacao seedlings infected with *Crinipellis pernicios*a. In **10th Inter- national Cocoa Research Conference**. 1988.

OTTMANN, C.; VAN DER HOORN, R. A. L.; KAISER, M.; *et al.* The impact of plant–pathogen studies on medicinal drug Discovery. **Chemical Society Reviews.**, v. 41, p. 3168–3178, 2012.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837-846, 2000.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência à doenças. In: LUZ, W.C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, p.1-52, 1994.

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

PERES FILHO, A. S. A. Agronegócio Brasileiro: ciência, tecnologia e competitividade. In: ARAÚJO, C. (Ed.) Cadeia produtiva do cacau. Brasília: CNPQ, p.275, 1998

PIRES, A. B. L.; GRAMACHO, K. P.; SILVA, D. C.; *et al.* Early development of *Moniliophthora perniciosa* basidiomata and developmentally regulated genes. **BMC Microbiology** (Online), v. 9, p. 158, 2009.

PIROVANI, C. P.; MICHELI, F. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. **Electrophoresis**, v. 29. n. 11, p. 2391-2401, 2008.

PURDY, L. H.; DICKSTEIN, E. R. Basidiocarp development on mycelial mats of *Crinipellis perniciosa*. **Plant Disease**, v. 74, p. 473-496, 1990.

PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of cacao witches' Broom: Biology, Epidemiology , and Management. **Annual. Reviews of. Phytopathology**, v. 34, p. 573-594, 1996.

PUNJA, Z. K.;ZHANG, Y. Y. Plant Chitinases and Their Roles in Resistance to Fungal Diseases. **Journal of Nematology**, v. 25, n. 4, p. 526-540, 1993.

QUAN, L. J.; ZHANG. B.; SHI, W. W.; LI, H. Y. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of Integrative Plant Biology.**, v. 50, n.1, p. 2-18, 2008.

QUIRINO, B.F.; CANDIDO, E. S.; CAMPOS, P. F.; FRANCO, O. L.; *et al.* Proteomic approaches to study plant-pathogen interactions. **C Phytochemistry**, v. 71, p.351-362, 2010.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123-130, 2003

RESHETNIKOV, A. S.; ROZOVA, O. N.; KHMELENINA, V. N.; *et al.* Characterization of the pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase from *Methylococcus capsulatus* Bath. **FEMS Microbiology Letters.**, v. 288, n. 2, p. 202-210, 2008.

RINCONES, J. *et al.* Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the witches' broom pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 21, n. 7, p. 891–908, 2008.

ROBERT, N.; FERRAN, J.; BREDA, C.; *et al.* Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* Pv. Pisi: expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. **European Journal of Plant Pathology.**, v. 107, n. 2, p. 249–261, 2001.

ROBERT, N.; ROCHE, K.; LEBEAU, Y.; *et al.* Expression of grapevine chitinase gene in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogen. **Plant Science**, v. 162, p.389–400, 2002.

RODRIGUES, F A.; LAIA, M. L.; ZINGARETTI, S. M. Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. **Plant science**, v. 176, p 286-302, 2009.

RYAN, C. A. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopatology**, v. 28, p. 425–449, 1990.

SACRISTÁN, S.; GARCÍA-ARENAL, F. The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 3, p. 369–384, 2008.

SANTIAGO, A. S. **Análise proteômica da interação cacau (*Theobroma cacao* L.) *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, fungo causador da vassoura-de-bruxa.** 2010. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.

SANTOS, M. A **Caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de tripsina do *Theobroma cacao* L.** 2014, Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Santa Cruz, 2014

SCARPECI, T. E.; ZANOR, M. I.; VALLE, E. M.. Investigating the role of plant heat shock proteins during oxidative stress. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n.10, p. 856-857; 2008.

SCARPARI L.M, et al. Bio-chemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil cause by *Crinipellis pernicioso*. **Journal of Experimental Botany** 56:865e877, 2005.

SCHMITZ-LINNEWEBER, C.; SMALL, I. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 12, p. 663-670, 2008.

SENA, K.; ALEMANN, L.; GRAMACHO, K. P. The infection process of *Moniliophthora pernicioso* in cacao. **Plant Pathology**, v.63, n.3, 2014.

SEO, J.; LEE, K. J. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n.1, p. 35-44, 2004

SHIMADA, N.; AOKI, T.; SATO, S.; *et al.* A Cluster of Genes Encodes the Two Types of Chalcone Isomerase Involved in the Biosynthesis of General Flavonoids and Legume-Specific 5-Deoxy(iso)flavonoids in *Lotus japonicus*. **Plant Physiol.**, v. 131, n. 3, p. 941–951, 2003.

SHIN, S.; ACKINTOSH, C. A.; LEWIS, J.; *et al.* Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum*. **Journal of Experimental Botany.**, v. 59, n. 9, p. 2371–2378, 2008.

SILVA, F. A. C.; PIROVANI, C. P.; MENEZES, S. Proteomic response of *Moniliophthora pernicioso* exposed to pathogenesis-related protein-10 from *Theobroma cacao*. **Genet. Mol. Res.**, v. 12, n. 4, p. 4855 – 4868, 2013

SILVA, R. A.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L. Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. Seropédica: Documentos Embrapa Agrobiologia. 49 p. 2008.

SILVA, S. D. V .M.; LUZ, E. D. M. N.; ALMEIDA, O. C.; *et al.* Redescritção da sintomatologia causada por *Crinipellis pernicioso* em cacauero. **Agrotropica**, v. 14, n.1, Edição especial. 2002.

SKADHAUGE, B.; THOMSEN, K.; VON WETTSTEIN, D. The role of barley testa layer and its flavonoid content in resistance to *Fusarium infections*. **Hereditas**, v. 126, p. 147–160, 1997.

SOUNIGO, O. *et al.* Assessment of the value of doubled haploids as progenitors in Cocoa (*Theobroma cacao* L.) breeding. **Journal of general and applied microbiology**, v. 49, n. 3, 2003.

SREENIVASAN, T.N. Dabydeen S. 1989. Modes of penetration of young cocoa leaves by *Crinipellis pernicioso*. **Plant Disease**. 73:478–81

SUÁREZ, C. C. Enfermedades del cacao y su control. In SUÁREZ, C. (Ed.). Manual del cultivo de cacao. 2. ed. Quevedo: Estación Experimental Tropical Pichilingue, Manual técnico, n. 25, p. 90-106, 1993.

SUN, H. H.; FUKAO, Y.; ISHIDA, S.; *et al.* Proteomics analysis reveals a highly heterogeneous proteasome composition and the post-translational regulation of peptidase activity under pathogen signaling in plants. **Journal of Proteome Research**., v. 12, n. 11, p. :5084-5095, 2013..

SURUJEDEO-MAHARAJ, S.; UMAHARAN, P.; BUTLER, D. R.; SREENIVASAN T. N. An optimized screening method for identifying levels of resistance to *Crinipellis pernicioso* in cocoa (*Theobroma cacao*) **Plant pathology**, v..52, n. 4,p. 464–475, 2003.

SWARBRICK, P. J.; SCHULZE-LEFERT, P.; SCHOLES, J. D. Metabolic consequences of susceptibility and resistance in barley leaves challenged with powdery mildew. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, p. 1061–1076, 2006.

OH, Y. T.; AHN, C. S.; *et al.* Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, n. 3, p. 246-253, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Tradução: SANTAREM, *et al.*, 3a ed., Porto Alegre: Artmed, p. 719, 2004.

TALON, M.; GMITTER JR. F. G. Citrus Genomics. **International Journal of Plant Genomics**, 17 p., 2008.

SRINIVASAN, T.; KUMAR, K.R. R.; KIRTI, P. B. Constitutive Expression of a Trypsin Protease Inhibitor Confers Multiple Stress Tolerance in Transgenic Tobacco. **Plant Cell Physiology**., v. 50, n.3, p. 541–553, 2009.

TATEDA, C.; YAMASHITA, K.; TAKAHASHI, F.; *et al.* Plant voltage-dependent anion channels are involved in host defense against *Pseudomonas cichorii* and in Bax-induced cell death. **Plant Cell Reports**. v. 28, p. 41-51, 2009.

TOGNOLLI, M.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; *et al.* Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Gene**, v. 288, p. 129–138, 2002.

TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. **Plant Biology (Stuttg)**., v. 7, n. 6, p. 581-591, 2005.

TSUKUDA, S.; GOMI, K.; YAMAMOTO, H.; *et al.* Characterization of cDNAs encoding two distinct miraculin-like proteins and stress-related modulation of the corresponding mRNAs in *Citrus jambhiri* Lush. **Plant Molecular Biology**., v.60, p.125–136, 2006.

VAN AKEN, O.; WHELAN, J.; VAN BREUSEGEM, F. Prohibitins: mitochondrial partners in development and stress response. **Trends in Plant Science** v.15, n. 5, 2010.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. Significance of inducible defence-related proteins in infected plants. **Annual Reviews Phytopathology**, v. 44, p. 135–162, 2006.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology** , v. 55, p. 85-97, 1999.

VOEGELE, R. T.; WIRSEL, S.; MÖLL, U.; *et al.* Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae* and analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v 19, n. 6, p. 625-634, 2006.

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

WANG, W. Y.; RIES, A.; KATIWU,; *et al.* The Arabidopsis Prohibitin Gene PHB3 Functions in Nitric Oxide–Mediated Responses and in HydrogenPeroxide–Induced Nitric Oxide Accumulation C Crawford. **The Plant Cell**, v. 22, p. 249–259, 2010.

WANG, W.; ZHOU, H.; LIN, H.; *et al.* Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 4818-4826, 2003.

WANG, Z.-L. *et al.* Catalases play differentiated roles in the adaptation of a fungal entomopathogen to environmental stresses. **Environmental microbiology**, v. 15, n. 2, p. 409–18, 2013.

WASINGER, V. C.; CORDWELL, S. J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; WILKINS, M. R.; DUNCAN, M. W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K. L.; HUMPHERY-SMITH, I. (1995) Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**. Vol. 16, edição 7, pp 1090-1094

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**, v.10, p. 103-116, 1985.

WOHLGEMUTH, H.; MITTELSTRASS, K.; KSCHIESCHAN, S.; *et al.* Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. **Plant Cell Environment**, v. 25, p. 717-726, 2002.

WU, L.; HAN, Z.; WANG, S.; *et al.* Comparative proteomic analysis of the plant–virus interaction in resistant and susceptible ecotypes of maize infected with sugarcane mosaic virus. **Journal of Proteomics**, v. 89, p. 124 – 140, 2013.

HAUSER, M.; EGGER, M.; WALLNER, M.; *et al.* Molecular properties of plant food allergens: A current classification into protein families. **The Open Immunology Journal**, v. 1, p. 1-12, 2008.

XAVIER-FILHO, J., CAMPOS, F. A. P. Proteinase inhibitors. In: CHEEK, P. R. *Toxicants of plant origin*. Boca Raton : **CRC Press**, v.3, p.1-27, 1989.

XIE, Y-R.; CHEN, Z-Y.; BROWN, R. L.; *et al.* Expression and functional characterization of two pathogenesis-related protein 10 genes from *Zea mays*. **J Plant Physiol.**, v. 167, n. 2, p. 121–130, 2010.



XIONG, J. S.; BALLAND-VANNEY, M.; XIE, Z. P.; *et al.* Molecular cloning of a bifunctional beta-xylosidase/alpha-L-arabinosidase from alfalfa roots: heterologous expression in *Medicago truncatula* and substrate specificity of the purified enzyme. **Journal of Experimental Botany.**, v.58, n.11, p. 2799-2810, 2007.

YAN, J.; HE, H.; TONG, S.; *et al.* Voltage-Dependent Anion Channel 2 of *Arabidopsis thaliana* (AtVDAC2) Is Involved in ABA-Mediated Early Seedling Development Jinping. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 10, p. 2476-2486, 2009.

YANG, H. Q.; GAO, H. J. Physiological function of arginine and its metabolites in plants, **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 1-8, 2007.

YOSHIOKA, H.; MASE, K.; YOSHIOKA, M.; *et al.* Regulatory mechanisms of nitric oxide and reactive oxygen species generation and their role in plant immunity. **Nitric Oxide**, v. 25, p. 216-221, 2011.

ZADRAŽNIKA, T.; HOLLUNGB, K.; EGGE-JACOBSENC, W.; *et al.* Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **JOURNAL OF PROTEOMICS**, v. 78, p. 254 -272, 2013.

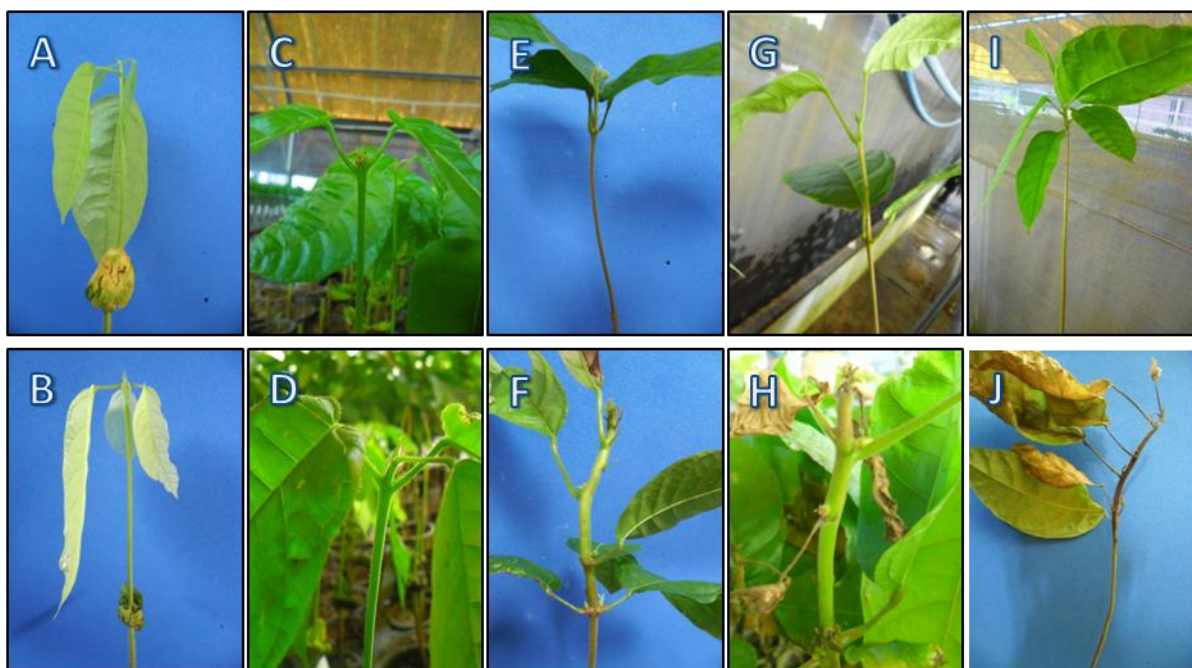
ZAGORCHEV, L.; . SEAL, C. E.; KRANNER, I.; *et al.* A Central Role for Thiols in Plant Tolerance to Abiotic Stress. **International. Journal of. Molecular. Sciences.**, v.14, p. 7405-7432, 2013.

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

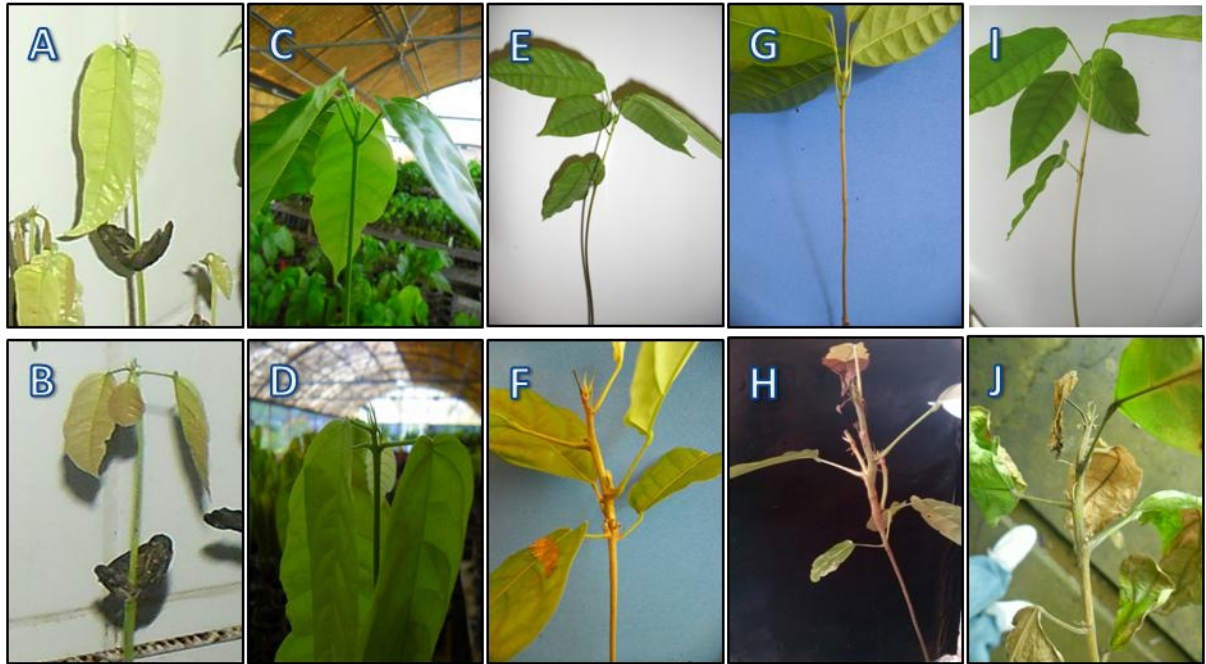
ZHOU, W.; EUDES, F.; LAROCHE, A., Identification of differentially regulated proteins in response to a compatible interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Triticum aestivum*. **Proteomics**, v. 6, 4599–4609, 2006.

## 8. ANEXOS

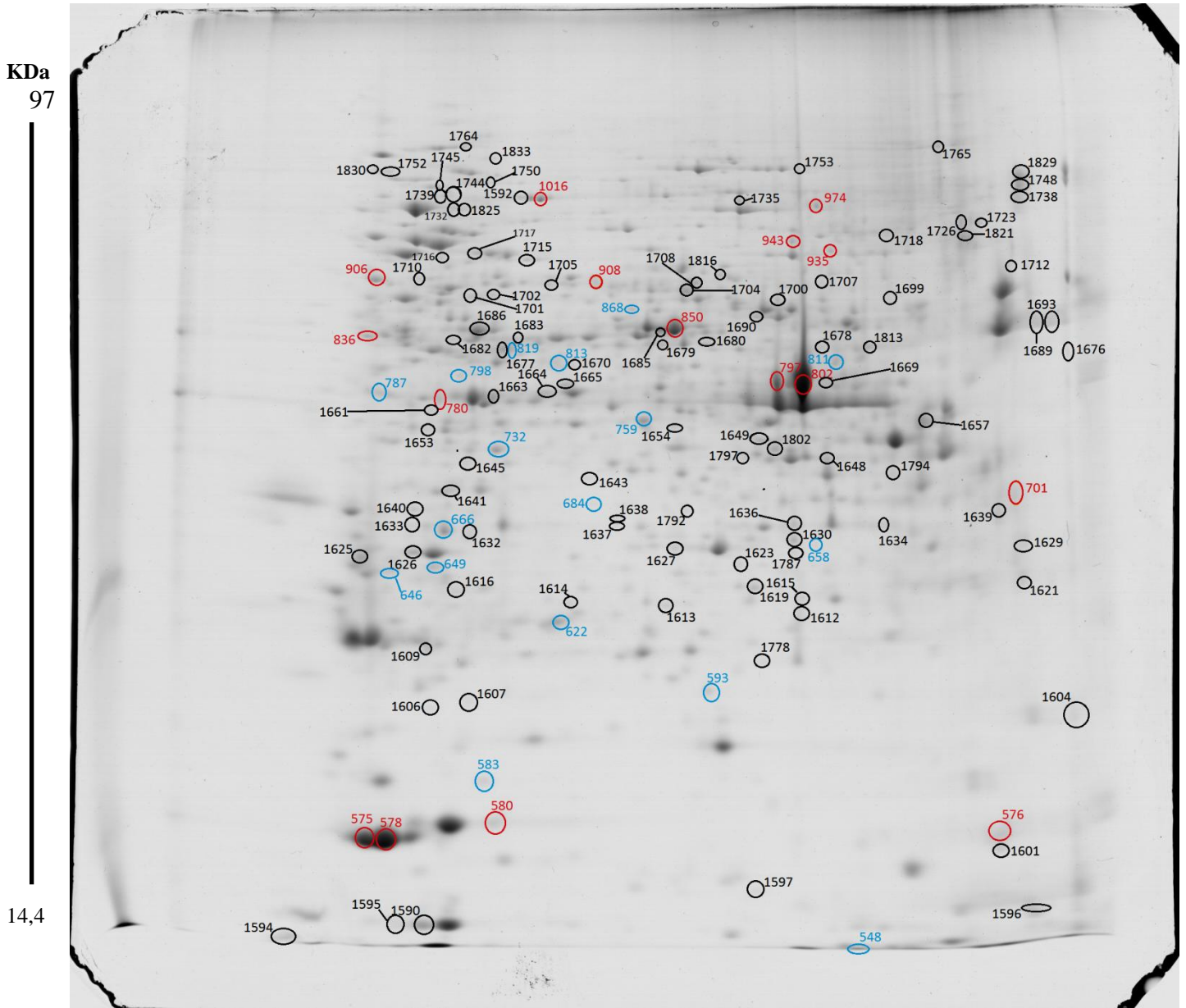
### Anexo 1



**Figura 2 :** Plântulas de Catongo com sintomas da doença vassoura-de-bruxxa. A: 72 horas não inoculado. B: 72 HAI. C: 15 dias não inoculado. D: 15 DAI. E: 45 dias não inoculado. F: 45 DAI. G: 60 dias não inoculado. H: 60 DAI. I: 90 dias não inoculado. J: 90 DAI.



**Figura 2 :** Plântulas de TSH 1188 com sintomas da doença vassoura-de-bruxa. A: 72 horas não inoculado. B: 72 HAI. C: 15 dias não inoculado. D: 15 DAI. E: 45 dias não inoculado. F: 45 DAI. G: 60 dias não inoculado. H: 60 DAI. I: 90 dias não inoculado. J: 90 DAI.

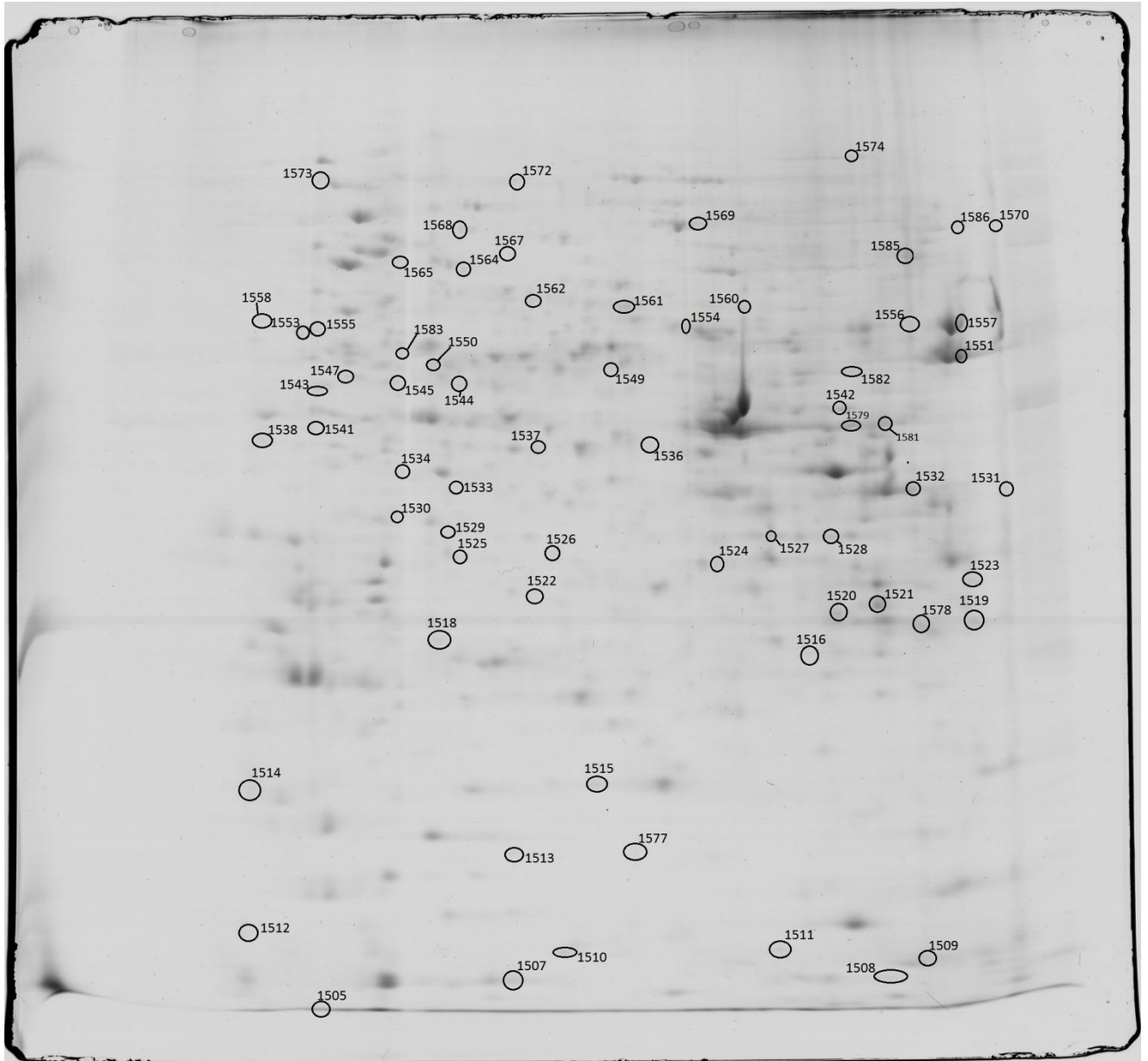


**Figura 1.** Mapa proteico referente às localizações das proteínas identificadas para o genótipo Catongo em 45 dias na condição não inoculada. Círculos em preto representam os *spots* onde foram identificadas proteínas exclusivas do tratamento não inoculado. Os círculos azuis (UP) e vermelhos (DOWN) representam as proteínas de ocorrência comum entre os tratamentos inoculado e não inoculado que apresentaram expressão diferencial ( $p \leq 0,05$ ) e variação de intensidade (razão)  $\geq 1,5$

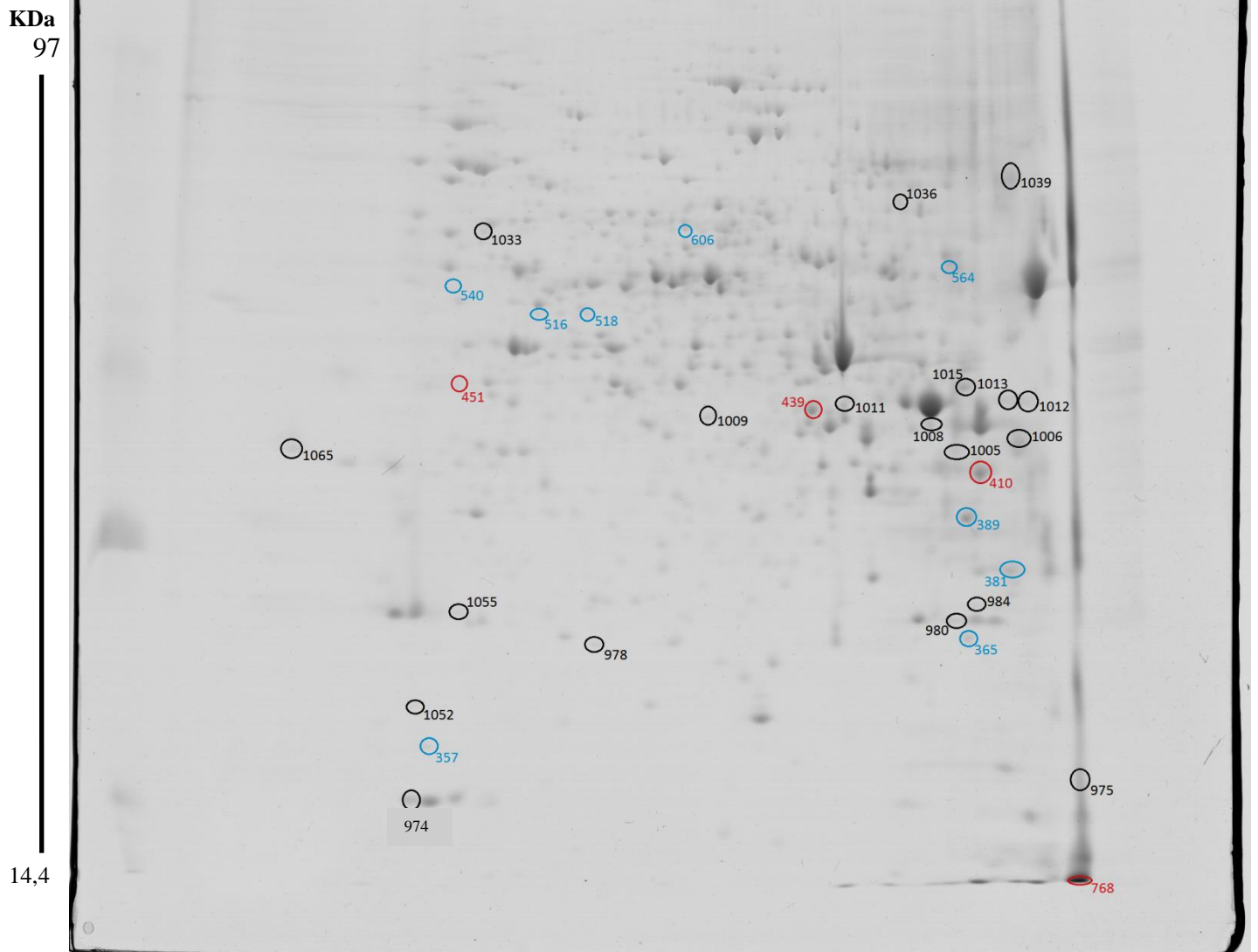
KDa

97

14,4



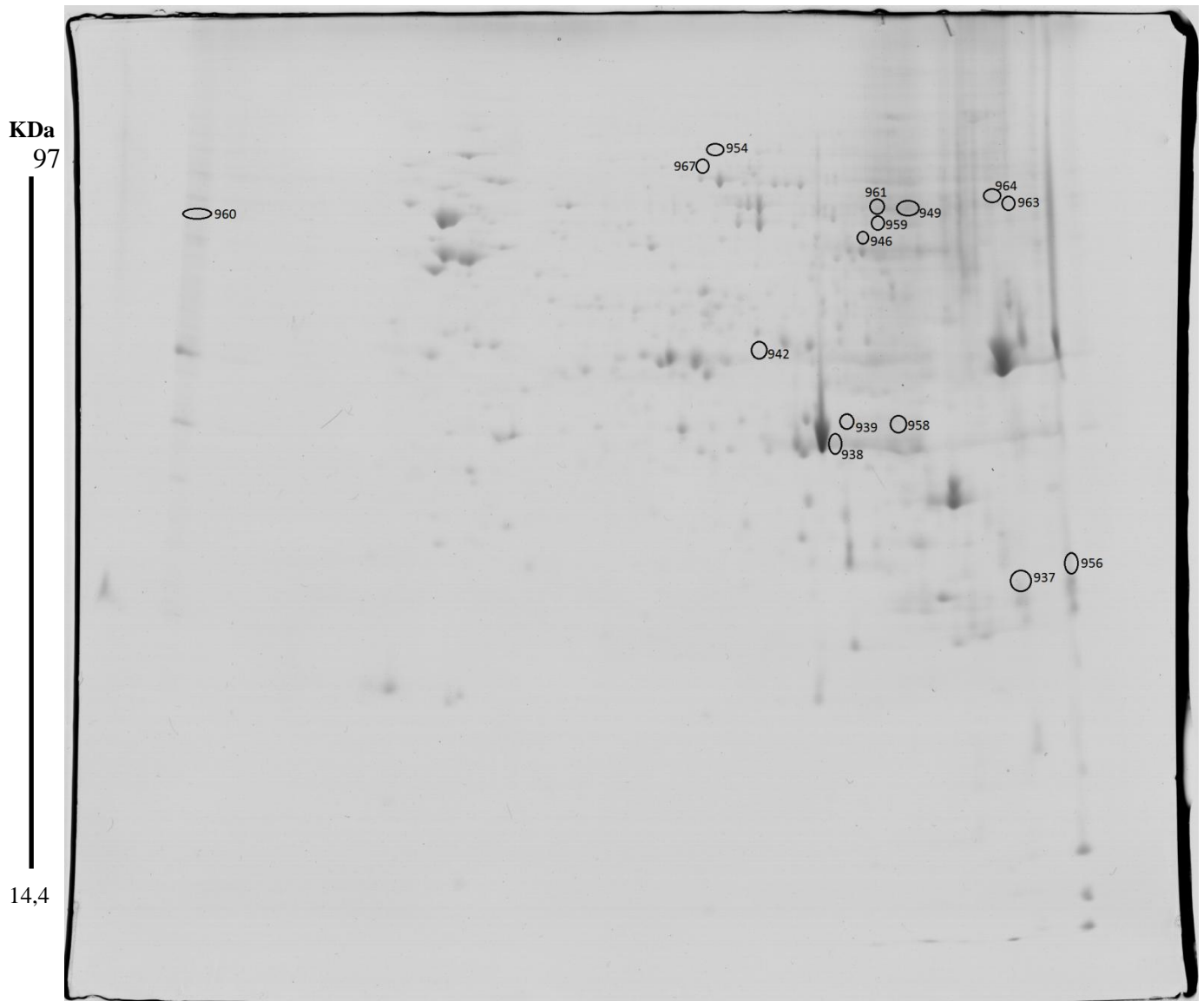
**Figura 2.** Mapa proteico referente às localizações das proteínas identificadas para o genótipo Catongo em 45 dias na condição infectada com fungo *M. perniciosa*. Círculos em preto representam os *spots* identificados exclusivamente para este tratamento.



**Figura 3.** Mapa proteico referente às localizações das proteínas identificadas para o genótipo TSH 1188 em 72 horas na condição não inoculada. Círculos em preto representam os *spots* onde foram identificadas proteínas exclusivas do tratamento não inoculado. Os círculos azuis (UP) e vermelhos (DOWN) representam as proteínas de ocorrência comum entre os tratamentos inoculado e não inoculado que apresentaram expressão diferencial ( $p \leq 0,05$ ) e variação de intensidade (razão)  $\geq 1,5$

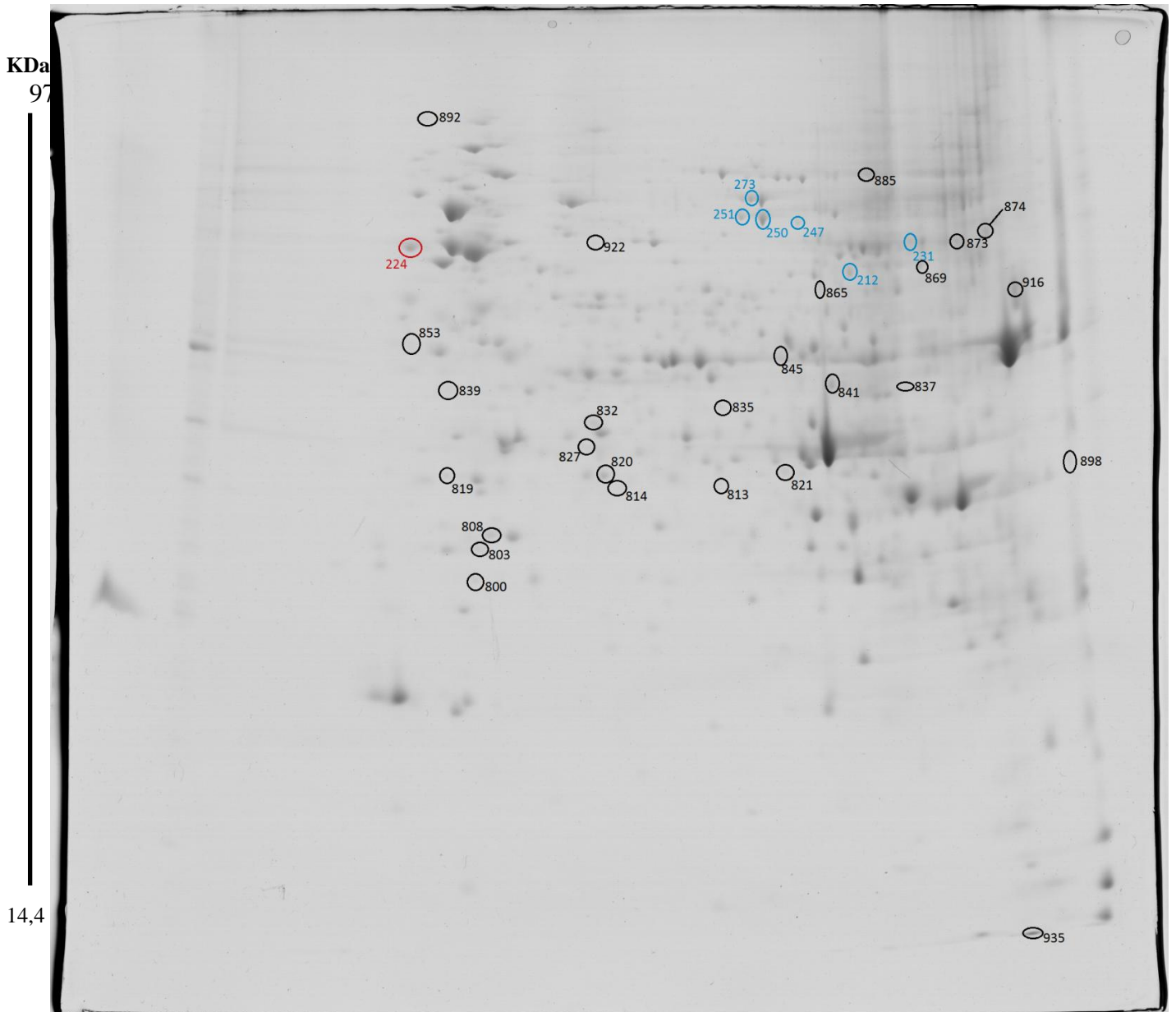


**Figura 4.** Mapa proteico referente às localizações das proteínas identificadas para o genótipo TSH 1188 em 72 horas na condição infectada com fungo *M. perniciosus*. Círculos em preto representam os *spots* identificados exclusivamente para este tratamento.



**Figura 5.** Mapa proteico referente às localizações das proteínas identificadas para o genótipo Catongo em 72 horas na condição infectada com fungo *M. perniciosus*. Círculos em preto representam os *spots* identificados exclusivamente para este tratamento.





**Figura 6.** Mapa proteico referente às localizações das proteínas identificadas para o genótipo Catongo em 72 horas na condição não inoculada. Círculos em preto representam os *spots* onde foram identificadas proteínas exclusivas do tratamento não inoculado. Os círculos azuis (UP) e vermelhos (DOWN) representam as proteínas de ocorrência comum entre os tratamentos inoculado e não inoculado que apresentaram expressão diferencial ( $p \leq 0,05$ ) e variação de intensidade (razão)  $\geq 1,5$ .