

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



Estudo da expressão gênica diferencial do cacaueteiro em
resposta a infecção por *Moniliophthora perniciosa*

Braz Tavares da Hora Júnior

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Março de 2008

Braz Tavares da Hora Júnior

Estudo da expressão gênica diferencial do cacauero em
resposta a infecção por *Moniliophthora perniciosa*

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

Área de concentração: Biotecnologia e Genômica

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Março de 2008

Braz Tavares da Hora Júnior

Estudo da expressão gênica diferencial do cacaueteiro em resposta a infecção por
Moniliophthora perniciosa

APROVADA: 31 de março de 2008

Prof. Dr. Sergio Herminio Brommonschenkel
UFV

Prof. Dra. Sonia Marli Zingaretti
UNAERD

Prof. Dr. Marcio Gilberto Cardoso Costa
UESC

Dra. Fabienne Micheli
UESC e Cirad-Orientadora

Aos meus pais, Braz Tavares e Liana Maria,
que propiciaram as condições para a minha
formação profissional, servido-me de carinho,
confiança, incentivo e compreensão em todos
os momentos da minha vida, **dedico.**

AGRADECIMENTOS

À Dra. FABIENNE FLORENCE LUCIENNE MICHELI, minha orientadora, pela oportunidade, confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. ABELMON GESTEIRA, pela orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. JÚLIO CEZAR DE MATTOS CASCARDO, pela orientação e amizade.

À Profa. DRA. SONIA MARLI ZINGARETTI, à Profa. Dra. MARIA INÊS TIRABOSCHI FERRO, pela hospitalidade, pelo apoio técnico e pela amizade no BCC Center e no LBM da UNESP/Jaboticabal.

À Dra. KARINA PERES GRAMACHO e os demais membros do laboratório de Fitopatologia do CEPEC/CEPLAC, pela colaboração no projeto e pela amizade

Ao Prof Dr. MARCIO GILBERTO CARDOSO COSTA, pela amizade.

Ao Dr. DOMINIQUE GARCIA, pela amizade.

Aos Mestres e alunos do PPGGBM/UESC MAIZA LOPES e CRISTIANO VILLELA, pela amizade, pelos ensinamentos e pela colaboração nos trabalhos.

Ao aluno de graduação ANDRÉ PACHECO, pelo apoio técnico e amizade.

Aos técnicos do Laboratório de Genômica e Expressão/UDESC ROBSON e PELÉ, pelo apoio nos trabalhos e amizade.

Aos meus colegas e amigos do PPGGBM/UDESC, pela amizade, pelos ensinamentos e pelo convívio.

Aos professores e funcionários do PPGGBM/UDESC, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos alunos do BCC Center e do LBM da UNESP/Jaboticabal em especial para KARINA, DANI, FLAVINHA, FABIANA, GUSTAVO, JÚLIO e JOSÉ PEREZ e a LEONARDO da UNESP/Botucatu, pela hospitalidade e pela amizade.

À minha família, em especial meus irmãos ANDRÉ e DIOGO e minha sobrinha LETÍCIA, ALINNE, HELENICE e VINÍCIUS, pela compreensão, amor e incentivo.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo, e à FAPESB e CNPq pelo apoio financeiro a este projeto.

ÍNDICE

EXTRATO	VI
ABSTRACT	VIII
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. INTERAÇÕES PLANTA-PATÓGENO.....	18
2.2. ANÁLISE EM LARGA ESCALA DA EXPRESSÃO GÊNICA EM INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. CONFECÇÃO DOS MACROARRANJOS.....	24
3.1.1. Escolha dos fragmentos de interesse	24
3.1.2. Mini preparação de DNA plasmidial	24
3.1.3. Amplificação dos fragmentos selecionados	25
3.1.4. Precipitação dos fragmentos amplificados.....	26
3.1.5. Transposição dos produtos de PCR de placas de 96 poços para as de 384 poços.....	26
3.1.6. Confecção das membranas de macroarranjo	27
3.2. OBTENÇÃO E MARCAÇÃO DE cDNAs ALVOS PARA HIBRIDAÇÃO.....	27
3.2.1. Inoculação de <i>M. pernicioso</i> em meristemas de cacau.....	27
3.2.2. Extração de RNA total de meristemas de cacau.....	27

3.2.3. Síntese da primeira fita de cDNA alvo	28
3.2.4. Síntese da segunda fita de cDNA alvo.....	29
3.2.5. Transcrição <i>in vitro</i>	29
3.2.6. Purificação do RNA amplificado	30
3.2.10. Síntese da primeira fita de cDNA alvo a partir de cRNA	30
3.2.11. Marcação dos cDNAs alvos	30
3.3. PRÉ-HIBRIDAÇÃO E HIBRIDAÇÃO DAS MEMBRANAS DE MACROARRANJO	31
3.4. LAVAGEM DAS MEMBRANAS.....	31
3.5. RECUPERAÇÃO DAS MEMBRANAS APÓS A HIBRIDAÇÃO	31
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS HIBRIDAÇÕES DOS MACROARRANJOS	32
4. RESULTADOS	34
5. DISCUSSÃO	61
5.1. OBTENÇÃO DOS PRIMEIROS ARRANJOS DO CACAUEIRO EM RESPOSTA A INFEÇÃO POR MONILIPHTHORA PERNICIOSA	61
5.2. GENES DIFERENTEMENTE EXPRESSOS ENTRE AS FASES INÍCIO, 30 DAI, 60 DAI NAS INTERAÇÕES COMPATÍVEIS E INCOMPATÍVEIS <i>T. CACAO-M. PERNICIOSA</i> E ENTRE GENÓTIPOS	64
5.3. COMPARAÇÃO COM OUTROS ESTUDOS DE EXPRESSÃO DE GENES EM CACAU DISPONÍVEIS NA LITERATURA	68
5.4. PERSPECTIVAS	69
6. CONCLUSÕES.....	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

EXTRATO

HORA JÚNIOR, Braz Tavares, M.S. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, março de 2008. **Estudo da expressão gênica diferencial do cacau em resposta a infecção por *Moniliophthora perniciosa***. Orientadora Dra. Fabienne Micheli. Co-orientador Prof. Dr. Abelmon Gesteira. Colaborador Prof. Dr. Júlio Cezar de Mattos Cascardo.

O fungo basidiomiceto hemibiotrófico *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora é o agente causador da vassoura-de-bruxa, a principal doença afetando a produção de cacau (*Theobroma cacao* L.) no Brasil, principalmente no estado da Bahia. A diminuição da produção de cacau foi responsável por um problema regional complexo com implicações sociais, econômicas e ecológicas para toda a região produtora de cacau do Estado. Os estudos de genômica funcional têm sido desenvolvidos para o melhor entendimento da interação cacau-*M. perniciosa* e para o desenvolvimento de métodos efetivos para o melhoramento genético. A análise de hibridação via macroarranjos de cDNA tem sido utilizada nos estudos de interação planta-patógeno para a elucidação simultânea dos mecanismos de resistência e/ou defesa, por meio da identificação e caracterização dos genes diferentemente expressos entre genótipos contrastantes para a resposta de infecção ao patógeno. Com objetivo de identificar os genes envolvidos na resistência de *T. cacao* e os eventos biológicos associados ao processo de infecção da planta pelo fungo, foi obtido o macroarranjo da interação resistente e suscetível, contendo 2855 clones de cDNA. Os acessos de cacau resistente (TSH 1188) e suscetível (Catongo) foram crescidos em casa de vegetação no CEPEC/CEPLAC e os meristemas apicais inoculados com basidiósporos de *M. perniciosa*.

Os meristemas de plantas controle e infectadas foram coletados nos pontos Início (24, 48 e 72h após a inoculação), 30 e 60 dias após a inoculação (dai) e foram feitas as extrações de RNA do material vegetal. Os cDNA alvo foram obtidos adicionando-se um passo de transcrição *in vitro* na sua síntese. A marcação dos cDNA alvos e hibridação das membranas foram feitas utilizando-se o kit AlkPhos Direct Labelling and Detection (Amersham) e as imagens das hibridizações foram analisadas pelo programa BZScan. Aos dados primários foram aplicados a análise exploratória com recursos gráficos (gráficos MA e gráficos em caixa), a normalização global, o teste estatístico F e a análise de agrupamento hierárquico. Cento e doze genes em Catongo e 78 em TSH 1188 foram identificados como diferentemente expressos e dividiram-se em seis maiores grupos de expressão, cada. Entre os genes induzidos ganham destaque os encontrados no *pool* Início em TSH 1188 como possivelmente relacionados à resistência, e no *pool* Início e 30 dai em Catongo como envolvidos na suscetibilidade e no desenvolvimento de morte celular programada. Os resultados reportados aqui fornecem a primeira análise de expressão em grande escala da interação *M. pernicioso*-*T. cacao*, contribuindo para o entendimento dos mecanismos de resistência e susceptibilidade dessa complexa interação.

Palavras-chave: Interação planta-patógeno; resposta de defesa; arranjos de cDNA.

ABSTRACT

HORA JÚNIOR, Braz Tavares, M.S. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, March 2008. **Study of differential gene expression of cocoa tree infected by *Moniliophthora perniciosa***. Advisor Dra. Fabienne Micheli. Co-advisor Prof. Dr. Abelmon Gesteira. Collaborator Prof. Dr. Júlio Cezar de Mattos Cascardo.

The hemibiotrophic basidiomycete *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora is the causal agent of the cocoa witches' broom, the main disease affecting the cocoa production (*Theobroma cacao* L.) in Brazil, mainly in the State of Bahia. The decrease of cacao production has been responsible for important social, economical and ecological problems in Brazil. Functional genomics studies have been developed to better understand the cocoa-*M. perniciosa* interaction and to develop effective methods for plant breeding. The analysis of cDNA macroarray hybridization has been utilized in plant-pathogen interaction studies for elucidation of both resistance and defense mechanisms, through identification and characterization of genes differentially expressed among genotypes of contrasting responses to pathogen attack. In order to identify genes from *T. cacao* involved in resistance and biological events associated to fungal virulence, it was developed in the present study, macroarrays from cDNA libraries (2855 cDNA clones) of resistant and susceptible interaction. Resistant (TSH 1188) and susceptible (Catongo) cocoa varieties were grown in greenhouse and apical meristems were inoculated with *M. perniciosa* basidiospores. Meristems of control and infected plants were harvested at 24, 48 and 72 h after inoculation (hai) composing the Initial pool, and at 30 and 60 days after inoculation (dai). RNA was extracted and the cDNA targets were obtained adding an *in vitro* transcription step in their

synthesis. cDNA target labeling and membrane hybridizations were carried out using the AlkPhos Direct Labelling and Detection System kit (Amersham). Images of the hybridizations were analyzed with the BZScan software. To the primary data were applied an exploratory analysis using graphic tools (MA plot and box plot), global normalization, statistical test F and hierarchical clustering analysis. One hundred and twelve genes in Catongo and 78 in TSH 1188 were differentially expressed and divided each in six major expression clusters. Amongst the up-regulated genes we focused our attention on those found in the Initial pool from TSH 1188 as genes potentially involved in resistance, and on those found in the Initial pool and 30 dai from Catongo as genes potentially involved in susceptibility and programmed cell death, respectively. We report here the first large scale expression analysis of *T. cacao-M. perniciosa* interaction, contributing to understand the resistance and susceptible mechanisms of this complex interaction.

Key-words: plant-pathogen interaction; defense response; cDNA arrays.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Sintomas das três principais doenças em frutos de <i>Theobroma cacao</i>	15
Figura 2: Sintomas da vassoura-de-bruxa em brotos vegetativos de <i>Theobroma cacao</i> no campo.....	17
Figura 3: Eletroforese do perfil das bandas do DNA plasmidial em gel de agarose.....	25
Figura 4: Eletroforese do perfil das bandas dos produtos de PCR em gel de agarose.....	26
Figura 5: Auto-radiografia da membrana hibridada com cDNA alvo de Catongo 60 dai.....	35
Figura 6: Visão tridimensional dos spots evidenciando a qualidade das repetições dentro da membrana.....	35
Figura 7: Os gráficos em caixa representando a distribuição dos dados da razão dos log2 antes e após a normalização em comparação ao controle.....	36
Figura 8: Distribuição dos dados normalizados da variedade Catongo e TSH 1188 usando os gráficos MA.....	37
Figura 9: Diagrama de Venn representando os 112 genes diferentemente expressos da variedade Catongo	39
Figura 10: Diagrama de Venn representando os 78 genes diferentemente expressos da variedade TSH 1188	39
Figura 11: Classificação funcional dos 112 genes diferentemente expressos na variedade Catongo	41
Figura 12: Classificação funcional dos 78 genes diferentemente expressos na variedade TSH 1188.....	42
Figura 13: Agrupamento hierárquico mostrando o perfil de expressão gênica temporal na variedade Catongo com os 112 genes estatisticamente significantes	45
Figura 14: Representação gráfica dos perfis dos seis principais grupos observados no agrupamento hierárquico da variedade Catongo.	46

Figura 15: Agrupamento hierárquico mostrando o perfil de expressão gênica temporal na variedade TSH 1188 com os 78 genes estatisticamente significantes	48
Figura 16: Representação gráfica dos perfis dos seis principais grupos observados no agrupamento hierárquico da variedade TSH 1188.	49
Tabela 1: Lista dos 112 genes diferentemente expressos na variedade Catongo.	50
Tabela 2: Lista dos 78 genes diferentemente expressos na variedade TSH 1188.	55
Tabela 3: Lista dos 62 genes diferentemente expressos entre as variedades TSH 1188 e Catongo (TSH 1188/Catongo) nas fases Início, 30 dai e 60 dai.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
µl	microlitro
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
BCC Center	<i>Brazilian Clone Colletion Center, Jaboticabal, São Paulo, Brasil</i>
BTH	benzothiadiazole
cDNA	DNA complementar
CEPEC	Centro de Pesquisas do Cacau da CEPLAC
CEPLAC	Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Ilhéus, Bahia, Brasil
CIRAD	<i>Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, França</i>
cm	centímetros
cRNA	RNA complementar
dai	dias após inoculação
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
EAO	espécies ativas de oxigênio
EST	seqüências de etiquetas expressas
ET	etileno
g	unidades de gravidade
h	horas
JA	ácido jasmônico
mol.L ⁻¹	Mol por litro

meio LB	meio Luria-Bertani
min	minutos
MJE	metil jasmonato e etileno
mL	mililitro
mmol.L ⁻¹	milimol por litro
MO	doença da monilíase
Nep1	necrosis and ethylene-inducing proteins 1
PCD	morte celular programada
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	potencial hidrogeniônico
PP	doença da podridão-parda
qRT-PCR	<i>quantitative Reverse Transcription PCR</i>
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i>
RNA	ácido ribonucléico
RPM	rotações por minutos
s	segundos
SA	ácido salicílico
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
SAR	resistência sistêmica adquirida
SN	sobrenadante
SSH	hibridação subtrativa seguida de PCR
TA	temperatura ambiente
U	unidade
UESC	Universidade Estadual de Santa Cruz
UV	luz ultravioleta
VB	doença da vassoura-de-bruxa

1. INTRODUÇÃO

As doenças são o principal fator limitante da produção de cacau (*Theobroma cacao* L.), causando perdas de cerca de 30-40% de todo o potencial mundial dessa cultura (HEBBAR, 2007). Estas perdas são devido à redução na produção e na qualidade das amêndoas em todas as áreas produtoras de cacau no mundo, especialmente em pequenas e médias propriedades nas Américas Central e do Sul e na África Ocidental.

As cinco principais doenças do cacau são: a podridão parda (PP), causada por um complexo de espécies de *Phytophthora* (*P. palmivora*, *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. heveae* e *P. megakarya*), a vassoura-de-bruxa (VB), causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (= *Crinipellis perniciosa*), inchaço do colmo causado pelo Cocoa Swollen Shoot Vírus – CSSV, a morte-descendente (“Vascular-Streak Dieback – VSD”) causada por *Oncobasidium theobromae* e monilíase (MO), causada por *Moniliophthora roreri*.

As doenças mais significantes são a VB, que ocorre principalmente na América do Sul, a MO, na América Central e no centro da América do Sul e a PP, de ampla distribuição nos trópicos (Figura 1). Embora a PP tenha um maior efeito em escala mundial, por ser a principal doença que causa perdas nos maiores países produtores da África Ocidental (GUEST, 2007; PLOETZ, 2007), a VB e a MO, possuem grande importância regional por causarem perdas que variam de 30 a 90% (GRIFFITH et al., 2003; PHILLIPS-MORA e WILKINSON, 2007; HEBBAR, 2007). Um bom exemplo desse impacto devastador foi a redução da produção de cacau do Brasil em cerca de 75% (de 400.000 para 100.000 ton) pela VB em somente 10 anos (PEREIRA et al., 1996).



Figura 1: Sintomas das três principais doenças dos frutos de *Theobroma cacao*. (A) monilíase causada por *Moniliophthora roreri*; (B) Podridão parda causada por *Phytophthora palmivora*; (C) Vassoura-de-bruxa causada por *Moniliophthora perniciosa*. Fonte: Phillips-Mora e Wilkinson (2007), Guest (2007) e CEPLAC.

A VB levou o Brasil de primeiro maior produtor mundial no século XX para o quinto lugar na atualidade, com 4,6% da produção mundial, sendo a principal doença que reduz a produção do país. Essa queda de produção ocorreu principalmente no Estado da Bahia, onde a VB foi detectada em 1989, afetando a maior região produtora de cacau na América do Sul até então livre da doença (BASTOS, 1990). A alta densidade de plantações de cacau na zona da Mata Atlântica da Bahia e a ausência de uma distinta estação seca têm contribuído para a ocorrência epidêmica de *M. perniciosa* em cacau devido a grandes pressões de inóculo, alcançando quase toda a região produtora do estado em apenas três anos (PEREIRA et al., 1996; GRIFFITH et al., 2003). Em menos de uma década, a doença ocasionou um problema regional complexo com implicações sociais, econômicas e ecológicas para toda a região produtora de cacau do Estado (ANDERBRHAN et al., 1999).

Os principais sintomas da VB em *T. cacao* ocorrem quando os basiodiósporos do fungo infectam o tecido meristemático (brotos vegetativos, almofadas florais, flores simples e frutos em desenvolvimento), levando a sintomas característicos dependendo do órgão

infectado e do estado de desenvolvimento. Crescimento hipertrófico (“vassouras”) é observado em brotos vegetativos, frutos partenocárpicos (conhecidos como “moranguinhos”) em almofadas florais e flores simples, e perdas das amêndoas quando infecta frutos em desenvolvimento, sendo esses dois últimos os principais sintomas que reduzem a produção (PURDY e SCHMIDT, 1996).

O fungo apresenta duas fases de parasitismo bem distintas. Na fase biotrófica/parasítica, o fungo cresce intercelularmente causando a hipertrofia e hiperplasia dos tecidos, perdas de dominância apical e proliferação de outros brotos axilares originando ramos anormais denominados de “vassouras verdes”. Na fase saprofítica/necrotrófica, o fungo cresce intracelularmente e causa necrose e morte dos tecidos infectados, produzindo o sintoma de “vassoura seca”. A produção de basidiocarpos e de basidiósporos ocorre nos tecidos necróticos infectados (MUSE et al., 1996; KILARU e HASENSTEIN, 2005; SCARPARI et al., 2005; CEITA et al., 2007) (Figura 2).

Atualmente, várias estratégias de controle têm sido deflagradas pelos governos federal e estadual, no sentido de tentar recuperar a cacauicultura, incluindo a clonagem de variedades resistentes e o controle biológico, dentre outros (PURDY e SCHMIDT, 1996; KRAUSS e SOBERANIS, 2002; SURUJDEO-MAHARAJ et al., 2003; ANEJA et al., 2005). Em paralelo, desde 2000 foram implantados programas de seqüenciamento em grande escala, como o Projeto Genoma do *Moniliophthora perniciosa* (www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura) e o projeto de estudo da interação cacau-*M. perniciosa* (Colaboração UESC-CEPLAC-CIRAD), com o objetivo de fornecer dados moleculares sobre a biologia do fungo e da planta para auxiliar em programas de melhoramento genético do cacauero no Brasil.

Desde então, as mudanças bioquímicas dos ramos de cacauero infectados com o fungo da VB foram demonstradas por Scarpari et al. (2005), evidenciando um aumento na quantidade de etileno, taninos e glicerol na vassoura verde. A alta variabilidade do patógeno em nível genético e cromossômico foi mostrada por Rincones et al. (2006). No nível da interação foi demonstrado que o *M. perniciosa* provoca morte celular programada (PCD) nos tecidos infectados para aumentar a disponibilidade de nutrientes (CEITA et al., 2007) e que o fungo expressa uma proteína capaz de induzir morte celular em cacauero (GARCIA et al., 2007). Além disso, trabalhos metodológicos como otimização de extração de RNA de meristemas de cacauero ricos em polifenóis e polissacarídeos (GESTEIRA et al., 2003) e avanços citológicos nos estudos da fase biotrófica de *M. perniciosa* (MEINHARDT et al., 2006) foram desenvolvidos.



Figura 2: Sintomas da vassoura-de-bruxa em brotos vegetativos de *Theobroma cacao* no campo. (A) Sintomas de vassoura-verde; (B) e (C) vassoura-verde com necroses parciais; (D) vassoura-seca. Fonte: Scarpari et al. (2005).

A geração de seqüências de etiquetas expressas (EST) da interação *T. cacao*-*M. pernicioso* foi primeiramente relatada por Gesteira et al. (2007) que utilizando meristemas infectados de duas variedades de cacaueteiro, uma suscetível (Catongo) e outra resistente (TSH 1188) a VB, gerou cerca de 6884 seqüências correspondentes a 2926 consensos de seqüências únicas (*unigene set*). Leal-Jr et al. (2007) obtiveram 187 consensos de seqüências únicas das variedades ICS 39 (genótipo suscetível) e CAB 214 (resistente) de cacaueteiro utilizando a abordagem de bibliotecas subtrativas de cDNA (SSH).

Dentro desse contexto, o presente trabalho teve por objetivo identificar genes diferencialmente expressos em cacaueteiro resistente e suscetível em resposta a inoculação com o fungo *M. pernicioso*, utilizando macroarranjos em membranas de náilon de alta densidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Interações planta-patógeno

A interação entre a planta e o patógeno pode ser dividida em dois tipos básicos: a interação compatível e a interação incompatível. Na interação compatível (suscetível) o patógeno invade o tecido vegetal, estabelece a relação parasítica e coloniza os tecidos, provocando a doença. Na interação incompatível (resistente), a planta é capaz de restringir o desenvolvimento do patógeno impedindo sua multiplicação e produzindo resistência (CHISHOLM et al., 2006).

Tradicionalmente, a resistência genética é classificada em dois tipos diferentes: resistência qualitativa (raça específica ou monogênica) e quantitativa (raça não específica ou poligênica). A resistência qualitativa é mediada por genes de resistência (genes R), que levam às respostas de hipersensibilidade (HR) raça específica. Esse modelo é a base do modelo gene-a-gene de Flor (1971), pelo qual uma proteína de avirulência (avr) derivada do patógeno é reconhecida direta ou indiretamente pela correspondente proteína R na planta; a proteína R e sua maquinaria associada ativam as respostas de defesa limitando a infecção (DANGL e JONES, 2001). A resistência quantitativa é controlada por muitos genes que interagem e não previnem a infecção, mas diminuem em muito o desenvolvimento do patógeno no sítio de infecção na planta (COLON et al., 1995).

Durante a interação planta-patógeno o foco da atividade do patógeno está na colonização do hospedeiro e utilização de seus recursos (nutrientes), enquanto a planta deve estar apta em detectar a presença do patógeno e responder com defesas antimicrobianas e outras respostas de defesa ao estresse (WAN et al., 2002). Uma série de respostas de defesa é induzida durante as interações planta-patógeno incompatível (HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996). Influxo de cálcio e outros íons são observados, e proteínas kinases são ativadas. A produção de compostos de sinalização, como intermediários de espécies reativas

de oxigênio (EAO), ácido salicílico (SA), óxido nítrico (NO), etileno (ET) e ácido jasmônico (JA), causam ativação de muitas respostas de defesa. A síntese de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PRs), peptídeos antimicrobianos, compostos fenólicos, flavonóides e outras fitoalexinas são induzidas e respostas de reforçamento da parede celular são ativadas. A resposta de hipersensibilidade (HR), uma resposta de PCD no sítio de infecção do patógeno é induzida quando proteínas de avirulência do patógeno são reconhecidas pelas proteínas R do hospedeiro (SCHENK et al., 2000; DONG, 2001; REYMOND, 2001; CHEONG et al., 2002; MAOR e SHIRASU, 2005; VAN LOON et al., 2006).

As alterações que constituem a resposta de defesa das plantas frente à infecção causada por patógenos têm sido intensamente estudadas com o objetivo de desenvolver marcadores moleculares para o melhoramento vegetal e de entender as suas bases evolutivas (DEMPSEY et al., 1998; GONZÁLEZ et al., 2006). Segundo Desender et al. (2007), poucos estudos descrevem as respostas de defesa em interações compatíveis, e o entendimento do quanto as interações compatível e incompatível são similares e diferentes é de importância para obter uma resistência durável engenheirada ou natural no controle de patógenos de plantas.

Com o acesso a seqüências genômicas completas ou EST, acoplado com rápida acumulação de dados relacionados aos padrões de expressão de RNA e proteínas, tem sido possível determinar compreensivamente como os genes contribuem para fenótipos complexos como a interação planta-patógeno (WISE et al., 2007).

2.2. Análise em larga escala da expressão gênica em interação planta-patógeno

As interações planta-patógeno e a rede de sinalização de defesa são extremamente complexas e dinâmicas e as interações entre o patógeno e a planta são difíceis de monitorar com os métodos genéticos e bioquímicos tradicionais (WAN et al., 2002). O seqüenciamento de DNA em larga escala tem fornecido informações sobre o número e a organização de genes e genomas de espécies de plantas e seus patógenos. Para uma melhor utilização desses dados primários é necessário identificar funções gênicas e grupos gênicos com papéis chaves em interações planta-patógeno suscetíveis e resistentes (KAZAN et al., 2001). Como o controle transcricional tem função chave durante a ativação das respostas de defesa (RUSHTON e SOMSSICH, 1998), a utilização de métodos que permitam detectar expressão gênica diferencial é particularmente apropriada para o estudo desse processo.

Segundo Perret et al. (1998), a diferença em expressão gênica pode ser mensurada analisando a correspondente variação nos níveis de expressão do mRNA. Assim, foram desenvolvidas várias metodologias para determinar a abundância relativa de determinados transcritos: *quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* – qRT-PCR (HEID et al., 1996), *Serial Analysis of Gene Expression* – SAGE (VELCULESCU et al., 1995), *cDNA Amplified Fragment Length Polymorphism* – cDNA-AFLP (BACHEM et al., 1996), hibridação subtrativa seguida de PCR – SSH (DIATCHENKO et al., 1996) e arranjos de cDNA (RUAN et al., 1998; DUGGAN et al., 1999).

O desenvolvimento da tecnologia de arranjos de DNA está revolucionando a genômica funcional, com vasto potencial para o entendimento das interações planta-microrganismo. O arranjo de DNA permite o monitoramento simultâneo dos níveis de expressão em larga escala, possibilitando a análise de genes em diferentes tipos de células ou em diferentes condições fisiológicas (KAZAN et al., 2001). A sua principal aplicação tem sido na análise da expressão gênica em organismos modelos, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*, porque suas seqüências genômicas completas estão disponíveis. Entretanto, a tecnologia de arranjo de DNA vem sendo aplicada em outros organismos, pois na ausência de seqüências genômicas completas, informações de seqüências de etiquetas expressas (EST) de plantas hospedeiras e também de seus patógenos podem ser utilizadas para a construção de arranjos de cDNA (TUNLID, 2003), permitindo a obtenção de informações sobre a expressão de milhares de genes.

O arranjo de DNA é definido como um ordenamento de dezenas, centenas ou milhares de moléculas de DNA únicas de seqüências conhecidas (sondas). Cada sonda é individualmente sintetizada em uma superfície rígida (usualmente vidro) ou pré-sintetizada (oligonucleotídeos ou insertos de uma biblioteca de cDNA) e depositada em uma plataforma (usualmente lâminas de vidro ou *chips* de silício para microarranjos, ou filtros de náilon para macroarranjos) de forma automática ou manual (BALDI e HATFIELD, 2002).

Para comparar a abundância dos níveis de expressão desses genes em uma amostra, o RNA ou o DNA é extraído (o alvo), marcado (fluoróforos para microarranjos, e radioisótopos ou enzimas para macroarranjos) e hibridado no arranjo de DNA (a sonda). Após a lavagem, a intensidade do sinal da sonda é detectada pela captação das emissões de fluorescência, radioatividade ou quimiluminescência, gerando uma imagem. Os *spots* nas imagens são quantificados e as intensidades são normalizadas. O passo final é a identificação dos genes,

que são significativamente regulados positiva ou negativamente e identificar os grupos de genes co-regulados (EISEN et al., 1998; BROWN e BOTSTEIN, 1999).

A densidade de genes em microarranjos pode atingir uma magnitude muito maior quando comparado à técnica de macroarranjos, cerca de 6.000 para macroarranjo e 30.000 ou até 250.000 para microarranjos de cDNA e oligonucleotídeos, respectivamente. Entretanto, esta metodologia é limitada, dado os altos custos destes ensaios e de equipamentos especiais, como para a detecção de sinais aliado a longos períodos de padronização da técnica (BALDI e HATFIELD, 2002). Macroarranjos de DNA, em membranas de náilon, empregam metodologias rotineiras, robustas e de fácil implementação na maioria dos laboratórios de biologia molecular, sem a necessidade de grandes investimentos e longos períodos de padronização, porém apresentam menor reprodutibilidade e sensibilidade do que os microarranjos (BALDWIN et al., 1999; KUHN, 2001).

O uso da tecnologia de arranjos de cDNA para análise de expressão em plantas iniciou-se com estudos preliminares de expressão de 45 genes em *A. thaliana* (SCHENA et al., 1995). Desde então, os arranjos de DNA foram utilizados nos estudos de respostas de defesa das plantas ao ataque de patógeno (bactérias, vírus, nematóides, fungos e oomicetos), respostas de defesas coordenadas entre as vias de sinalização mediadas por SA, JA e ET e análise da resistência quantitativa (KAZAN et al., 2001; WISE et al., 2007).

A aplicabilidade dessa técnica para monitorar a expressão gênica de interações planta-patógeno originou-se a partir dos estudos de reação de defesa (SHENK et al., 2000). Nesse estudo foi analisada a expressão de genes de *A. thaliana* em resposta incompatível à inoculação com o fungo *Alternaria brassicicola* ou tratamentos com SA, JA e ET.

Maleck et al. (2001) monitoraram as mudanças da expressão gênica durante a resposta de resistência sistêmica adquirida (SAR) em *A. thaliana*. Vários níveis de SAR foram observados analisando plantas tratadas com BTH (análogo de SA) e mutantes com fenótipo constitutivo ou reprimido da SAR.

Genes responsivos ao JA em *A. thaliana* (a partir de um experimento de macroarranjo com 2880 cDNAs) foram determinados, sendo identificados 41 genes envolvidos em senescência, transdução de sinal, biosíntese de JA, biosíntese de outros fitohormônios, defesa a patógenos e ferimentos, metabolismo de aminoácidos e metabolismo secundário (SASAKI et al., 2001). A abordagem de expressão global foi usada para estudar a rede de transdução de sinal que controla as respostas de defesa em mutantes de *A. thaliana* defectivos para genes envolvidos nas sínteses de SA ou JA, sendo os genes induzidos pelo ataque de *Pseudomonas syringae* organizados em grupos com expressão similar (GLAZEBROOK et al., 2003). Os

arranjos de DNA de plantas estimuladas com moléculas de sinalização (SA) e/ou de regulação dos genes de defesa (JA e ET) indicam uma rede com topologia altamente interconectada.

Em estudos com bactérias fitopatogênicas, a análise de microarranjo monitorou a troca do metabolismo básico para o metabolismo de defesa, com a troca dos circuitos regulatórios e de sinalização em *A. thaliana* infectada com a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. tomata para uma demanda de energia e capacidade biossintética (SCHEIDELER et al., 2002). Foram identificados 613 genes de pimenta transcricionalmente responsivos a *Xanthomonas axonopodis* pv. glycines (LEE et al., 2004). Genes de vários tipos funcionais, incluindo biossíntese/modificação de parede celular, transporte, rota de sinalização e reação de defesa foram induzidos nos estágios iniciais da infiltração da bactéria. Dabbas et al. (2006) verificaram nos resultados dos macroarranjos um comportamento diferenciado para cada variedade, suscetível e resistente, de cana-de-açúcar durante a interação com *Xanthomonas albilineans*, gerando informações que podem ser utilizadas no mapeamento de genes de resistência para o melhoramento da cana-de-açúcar.

A interação planta-vírus também foi analisada utilizando arranjos de DNA. A comparação das respostas de variedades de *A. thaliana* resistentes e susceptíveis ao vírus do mosaico do pepino foi determinada por Ishihara et al. (2004), indicando que ao menos um terço dos genes induzidos por este vírus foi previamente associados a respostas de defesa e estresse. Huang et al. (2005) demonstraram em análises de microarranjos em interação compatível *A. thaliana*-vírus do mosaico do pepino que a maioria dos genes relacionados a defesa é induzida de maneira dependente de SA.

A abordagem de arranjos de DNA na interação planta-nematóide foi investigada durante a interação do nematóide do cisto (*Heterodera glycines*) com raízes de soja, e genes induzidos por estresse em dois dias após a infecção foram determinados (KHAN et al., 2004). Jammes et al. (2005) investigaram a formação da galha na interação *A. thaliana*-*Meloidogyne* sp., apresentando novas idéias na formação das células gigantes de alimentação e na supressão das defesas da planta em associação com o estágio desenvolvimental do sítio de alimentação do nematóide. Mais recentemente, a comparação da expressão gênica em *A. thaliana* infectada por *Meloidogyne incognita* e *Heterodera schachtii* foi investigada por Fuller et al. (2007), contribuindo para o conhecimento de como a planta responde ao parasitismo desses nematóides e para as diferenças nos mecanismos de desenvolvimento e manutenção das estruturas de alimentação.

Nos estudos de interação de planta com fungos patogênicos, Rauyaree et al. (2001) utilizaram a abordagem de macroarranjos de bibliotecas de EST para elucidar os mecanismos

que regulam a fase inicial da doença entre arroz e o fungo *Magnaporthe grisea*. A comparação das respostas de defesa de coníferas (*Pinus sylvestris*) contra os fungos necrotróficos específicos de parte aérea (*Gremmeniella abietina*) e de raiz (*Heterobasidion annosum*) foram analisados via macroarranjos de cDNA, evidenciando que as respostas são órgão específicas (ADOMAS e ASIEGBU, 2006).

Eichmamm et al. (2006) verificaram, a partir de análise de macroarranjos, que 94 genes apresentam expressão diferenciada entre os cultivares de cevada (*Hordeum vulgare*) resistente e suscetível ao fungo *Blumeria graminis*. O perfil transcricional de canola (*Brassica napus*) ao fungo necrotrófico cosmopolita *Sclerotinia sclerotiorum* identificou mais de 300 transcritos associados à biosíntese de JA e sinalização de EAO e estrutura de parede celular (YANG et al., 2007).

A resistência quantitativa também é acessada por experimentos com arranjos de DNA e pode levar a identificação de novos marcadores para o melhoramento das espécies de plantas cultivadas (KAZAN et al., 2001). Ros et al. (2004) identificaram, a partir da análise de macroarranjos, 35 genes diferencialmente expressos no patossistema batata (*Solanum demissum*)-oomiceto *Phytophthora infestans*, entre os cultivares suscetível e moderadamente resistente. Wang et al. (2005) determinaram 348 genes de batata responsivos a *P. infestans*, relacionados com metabolismo, defesa, sinalização e regulação transcricional. Alignan et al. (2006) identificaram 38 genes diferentemente expressos envolvidos em defesa, sinalização e metabolismos de aminoácidos entre os genótipos susceptíveis e parcialmente resistente de girassol (*Helianthus annuus*) infectados com o fungo necrotrófico *Phoma macdonaldii*.

O primeiro relato da aplicação da tecnologia de arranjo de DNA em *Theobroma cacao* iniciou-se nos trabalhos de Jones et al. (2002), na demonstração do uso de 1.380 EST oriundos de bibliotecas de amêndoas e folhas em ensaios de microarranjos, comparando a expressão desses EST entre cinco variedades de cacau.

Nos trabalhos envolvendo respostas de defesa, Verica et al. (2004) realizaram análises de macroarranjos de 1.256 EST para identificar os genes responsivos em folhas de *Theobroma cacao* tratadas com moléculas sinalizadoras de defesa (SA, JA e ET) e pela Nep1 (proteínas induzidas por necrose e etileno).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Confeção dos macroarranjos

3.1.1. Escolha dos fragmentos de interesse

Para a confecção dos macroarranjos foram selecionados 1.675 EST da biblioteca resistente e 1.180 EST da biblioteca suscetível, representando o conjunto consenso de seqüências únicas (*unigene set*) das variedades Catongo (suscetível a *M. pernicioso*) e TSH 1188 (resistente a *M. pernicioso*) de *Theobroma cacao* L. (GESTEIRA et al., 2007). Após seleção *in silico* das 2.855 seqüências, os respectivos clones de *E. coli* contendo os insertos foram manualmente separados em capela de fluxo laminar e inoculados em 30 microplacas de 96 poços contendo 1,2 mL de meio LB. Os clones foram crescidos em incubadora-agitadora a 37°C e 260 rpm, *overnight*, para preparação das reações de mini preparação de DNA plasmidial.

3.1.2. Mini preparação de DNA plasmidial

As colônias crescidas em placas de inóculo foram centrifugadas a 2325 g, 20°C, por 10 min. O sobrenadante (SN) foi descartado e as placas foram secadas invertidas sobre papel absorvente por aproximadamente 2 min. Adicionou-se 200 µl de solução PI (10 mmol.L⁻¹ de EDTA pH 8,0; 26 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl pH 7,4 e 0,92% de glicose). Selou-se e agitou-se por 2 minutos em vórtex na velocidade máxima e centrifugou-se a 2325 g, 20°C, por 10 min. Desprezou-se o SN, e as placas foram secadas novamente invertidas sobre papel absorvente. Colocou-se 60 µl da solução PI, selou-se e agitou-se por 2 min em vórtex na velocidade máxima. Transferiu-se 60 µl da placa de inóculo para placas de fundo em U com 3 µl de

RNAse (10 mg/ml), e acrescentou-se 60 μ l da solução PII (0,5 mol.L⁻¹ de NaOH e SDS 1%). Misturou-se por inversão 40 vezes. Deixou-se 5 min em repouso. Acrescentou-se 60 μ l da solução PIII (3 mol.L⁻¹ de acetato de potássio pH 5,2 e 11,5% de ácido acético glacial), misturou-se invertendo 40 vezes e deixou-se 30 min em estufa a 90°C, seguido de 10 min em gelo. Centrifugou-se a 2325 g, 20°C por 10 min, e transferiu-se 70 μ l do SN para uma microplaca de fundo em V. Adicionou-se 70 μ l de isopropanol e centrifugou-se por 45 min a 2325 g e lavou-se o *pellet* com 200 μ l de etanol 70%, por três vezes. Descartou-se todo o SN e o *pellet* foi ressuscitado em 60 μ l de água Milli-Q. As amostras foram visualizadas em eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado com 0,5 μ g/ml de brometo de etídio (Figura 3).

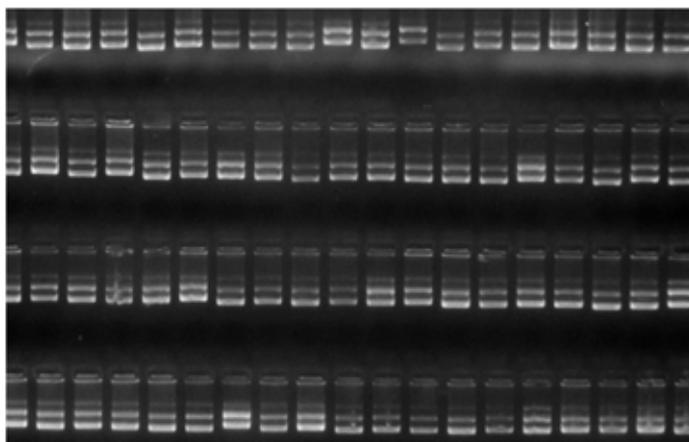


Figura 3: Eletroforese do perfil das bandas do DNA plasmidial em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

3.1.3. Amplificação dos fragmentos selecionados

Os DNAs plasmidiais foram diluídos na proporção de 1:100 com água Milli-Q. Para cada reação de PCR de 50 μ l utilizou-se: 6 μ l da diluição, 1X de tampão para PCR, 0,4 mmol.L⁻¹ de dNTPs, 1 mmol.L⁻¹ de MgCl₂, 0,2 μ mol.L⁻¹ dos *primers* pDNR-F (5'-ATC AGT CGA CGG TAC CGG AC-3') e pDNR-R (5'-ACA GCT ATG ACC ATG TTC AC-3'), 2U de Taq DNA Polimerase (Fermentas). O *touchdown* PCR foi realizado no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) utilizando para amplificação a temperatura inicial de 94°C por 5 min, seguida por 10 ciclos de 94°C por 40 s, 65°C para anelamento dos *primers* por 45 s com diminuição de 0,2°C por ciclo, e 72°C para extensão dos fragmentos por 1 min e 20 s. Imediatamente foram realizados 30 ciclos de 94°C por 40 s, 62°C por 45 s e 72°C por 1 min e

20 s. Após os ciclos, as reações permaneceram a 72°C por 7 min. Os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1% corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio (Figura 4).

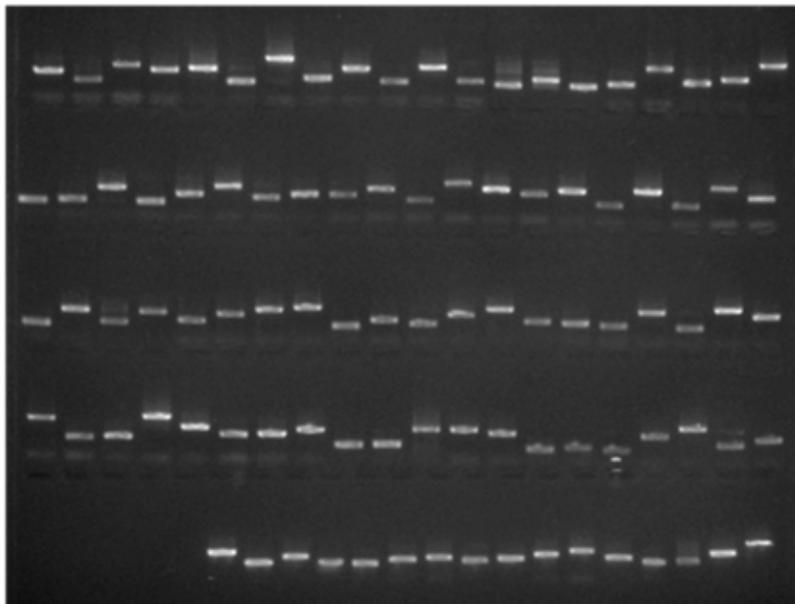


Figura 4: Eletroforese do perfil das bandas dos produtos de PCR em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

3.1.4. Precipitação dos fragmentos amplificados

O volume das amostras foi ajustado para 90 µl com água Milli-Q. Foi adicionado igual volume de isopropanol, centrifugou-se por 45 min, a 2325 g, e lavou-se o *pellet* com 200 µl de etanol 70%, por três vezes. Descartou-se todo o sobrenadante, secando sobre papel absorvente e deixou-se secar as placas em temperatura ambiente (TA). O *pellet* foi ressuspensionado em 20 µl de água Milli-Q.

3.1.5. Transposição dos produtos de PCR de placas de 96 poços para as de 384 poços

Os produtos de PCR foram transferidos de placas de 96 poços para placas de 384 poços, sendo que 15 µl de cada produto de PCR foram depositados nas placas de 384 poços, sendo em seguida acrescentado 15 µl de DMSO 100%.

3.1.6. Confeção das membranas de macroarranjo

Para confecção das membranas de macroarranjo, os produtos de PCR foram ordenados e imobilizados em membranas de náilon (Raybond-N+, Amersham) com auxílio do robô Q-Bot (Genetix) do BCC Center. As amostras foram depositadas em duplicata, sendo que cada produto de PCR foi depositado três vezes no mesmo ponto, com espaçamento de 900 micras entre cada ponto, num arranjo de 5x5. Em seguida as membranas foram primeiro submetidas a tratamentos em solução de desnaturação (1,5 mol.L⁻¹ de NaCl e 0,5 mol.L⁻¹ de NaOH) e depois de neutralização (1,5 mol.L⁻¹ de NaCl e 1 mol.L⁻¹ de Tris) por 5 e 10 min, respectivamente e, posteriormente, fixou-se o DNA à membrana por radiação com luz UV (1600 joules/cm²), seguindo as recomendações do fabricante (Genetix, UK). Na organização da membrana os produtos de PCR oriundos das bibliotecas TSH 1188 e Catongo foram separados em dois setores, com três arranjos de 5x5 com DNA plasmidial contendo insertos de *Xantomonas* formando controles internos em cada setor.

3.2. Obtenção e marcação de cDNAs alvos para hibridação

3.2.1. Inoculação de *M. pernicios* em meristemas de cacau

Plântulas das variedades Catongo (suscetível a *M. pernicios*) e TSH 1188 (resistente a *M. pernicios*) de *Theobroma cacao* L. foram crescidas em substrato previamente esterilizado na casa de vegetação do CEPEC/CEPLAC, sob luz natural e umidade relativa de 90%. O meristema apical de plântulas com idade de quatro semanas foi inoculado pelo método do *spray*, usando uma suspensão de 10⁵ mL⁻¹ basidiósporos do isolado Cp1441 CEPEC/CEPLAC de *M. pernicios*. Após a inoculação, as plântulas foram aclimatizadas durante 24 h a 25 °C ± 2 °C em uma atmosfera saturada de vapor de água para permitir a germinação dos esporos de *M. pernicios*, penetração e conseqüente infecção (FRIAS et al., 1995). Plântulas controle foram inoculadas com água estéril e submetidas às mesmas condições de crescimento. Sintomas típicos da doença foram observados em quatro semanas na variedade Catongo e o desenvolvimento da doença foi monitorado por 90 dias. Meristemas apicais inoculados e não inoculados (controle) de Catongo e TSH 1188 foram coletados a 24 h, 48 h, 72 h, 30 dias e 60 dias após inoculação (dai). Os meristemas apicais coletados foram congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80 °C até utilização.

3.2.2. Extração de RNA total de meristemas de cacau

O RNA total dos meristemas apicais foi extraído segundo Gesteira et al. (2003) com modificações. O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e homogeneizado com o tampão de extração ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido bórico, 10 mmol.L^{-1} de EDTA, 0,5% de SDS, 2% de β -mercaptoetanol). Após 5 min de incubação a TA, sob leve agitação, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 13148 g, em TA. O SN foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga e foi homogeneizado com igual volume de 2% de brometo de metiletanolamina (MATAB) e fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Centrifugou-se a 13148 g, 5 min, em TA. Em seguida, o SN foi purificado com igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugado nas mesmas condições anteriores. A precipitação foi feita acrescentando-se igual volume de isopropanol, centrifugando-se a 13148 g por 15 min e em seguida, lavando-se o *pellet* com 100 μl de etanol 70%. O *pellet* foi ressuscitado em 50 μl de água DEPC. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% corado com 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de brometo de etídio.

Os RNAs totais extraídos dos meristemas de cacaueteiro das variedades Catongo e THS 1188 infectados com *M. pernicioso* e não-infectados (controles), foram tratados com DNase I para remoção de possíveis contaminantes de DNA genômico nas amostras. A purificação ocorreu adicionando-se 1X *Reaction Buffer* contendo 25 mmol.L^{-1} de MgCl_2 e 1U de desoxirribonuclease I (Fermentas), em 45 μl de RNA total. A reação foi incubada a 37 °C, por 30 min, e logo em seguida foi encaminhada a purificação.

Para a purificação do RNA total utilizou-se o protocolo do RNeasy Mini Kit (Qiagen), partindo-se de 100 μl do RNA tratado com DNase, ao qual adicionou-se 350 μl do tampão RLT e depois 350 μl de etanol (96-100%). Aplicou-se a amostra em uma coluna RNeasy previamente colocada sobre tubos eppendorf de 2 mL e centrifugou-se por 15 s., 6708 g, em TA, descartando-se o filtrado. A coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga e a ela adicionou-se 500 μl de tampão RPE, centrifugando-se 15 s., 6708 g, em TA e descartando-se o tampão filtrado. Adicionou-se 500 μl de etanol 80%, repetindo as condições de centrifugação anteriores, e descartando-se o filtrado. A coluna foi centrifugada por 5 min, 6708 g, para secar a membrana de sílica e, em seguida as amostras foram eluídas em 20 μl de H_2O DEPC por centrifugação por 1 min, 6708 g, em TA.

3.2.3. Síntese da primeira fita de cDNA alvo

Devido às pequenas quantidades de material coletado (meristema apical com tamanho menor do que 1 cm nas primeiras fases da infecção) e as quantidades limitadas de RNA obtidos pelo protocolo segundo Gesteira et al. (2003) para *T. cacao*, o RNA foi amplificado a partir das amostras utilizando o protocolo desenvolvido por Wang (2005), no qual a quantidade de RNA foi amplificada linearmente utilizando-se uma etapa de transcrição *in vitro* (vide § 3.2.8).

A síntese da primeira fita de cDNA alvo foi realizada em um volume final de 12 µl, a partir de 5 µl de RNA total purificado e utilizando-se 0,1875 µg/µl de *primer* oligo dT(15)-T7 (5'-AAA CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGC T(15)-3') e 2 U de RNase Out (Invitrogen). A reação foi incubada a 70°C por 3 min. Após a incubação, a reação foi ajustada para 20 µl com as respectivas concentrações finais: 1X *First Strand Buffer*, 0,1875 µg/µl de *primer* TS (5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3'), 4 mmol.L⁻¹ de dNTPs e 200 U de RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas). A reação foi incubada a 42°C, por 1 h e 30 min.

3.2.4. Síntese da segunda fita de cDNA alvo

À reação de síntese da primeira fita adicionou-se 106 µl de água Milli-Q, 1X de *Advantage PCR Buffer*, 0,8 mmol.L⁻¹ de dNTPs, 1 U de RNase H e 3 µl de *Advantage cDNA Polymerase Mix* (Clontech), totalizando um volume de 200 µl. A reação foi incubada a 37°C por 5 min para a digestão do mRNA, 94°C por 2 min para desnaturação, 65°C por 1 min para anelamento dos *primers* e 75°C por 30 min para a extensão.

Para purificar o cDNA sintetizado, adicionou-se a reação 1 µl de acrilamida linear (0,1 µg/µl) e 150 µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). Após homogeneização por pipetagem, a solução foi transferida para tubos *Phase Lock Gel* (Eppendorf) e centrifugados por 5 min, 13148 g, em TA. O SN foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga e adicionou-se 70 µl de acetato de amônio 7,5 M e 1 mL de etanol 100% para a precipitação por centrifugação (20 min, 13148 g em TA). O *pellet* foi lavado com 800 µl de etanol 100%, centrifugado por 8 min a 13148 g, e ressuspenso em 30 µl de H₂O DEPC.

3.2.5. Transcrição *in vitro*

A transcrição foi realizada utilizando-se reagentes do kit RiboMAX Large Scale RNA Production System - T7 (Promega, USA), sendo que cada reação utilizou 1X de T7 *Transcription Buffer*, 5 mmol.L⁻¹ de cada rNTP, 1 U de RNase OUT (Invitrogen), 24,5 µl de cDNA purificado e 5 µl de T7 enzyme mix, totalizando um volume de 50 µl, sendo incubados a 37°C, por 4 horas.

3.2.6. Purificação do RNA amplificado

O RNA complementar (cRNA) foi purificado por adição de 500 µl de Trizol (Invitrogen) e 100 µl de clorofórmio. A reação foi homogeneizada por 3 min e, em seguida, centrifugada por 15 min, a 6708 g, em TA. O SN foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga, no qual foram adicionados 250 µl de isopropanol. A reação foi incubada por 5 min em gelo e, em seguida, centrifugada por 15 min a 6708 g. O *pellet* foi lavado com 800 µl de etanol 70% e ressuspendido em 20 µl de H₂O DEPC.

3.2.7. Síntese da primeira fita de cDNA alvo a partir de cRNA

Incubou-se a 70°C, por 3 min, 8 µl de cRNA, 2 µg/µl de *primer random hexamer* (dN6), em volume de 11 µl. Após incubação, foram adicionados os seguintes reagentes: 1X *First Strand Buffer*, 4 mmol.L⁻¹ de dNTPs, 2 µg/µl de primer oligo dT(15)-T7, 2U de RNase OUT (Invitrogen) e 200 U de RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas), totalizando um volume de 40 µl. A reação foi incubada a 42°C, por 1 h 30 min. A quantificação do cDNA alvo foi realizada em espectrofotômetro GeneQuant Pro (Amersham). A concentração dos cDNA alvos permaneceram entre 1100 e 1400 ng/µl.

3.2.8. Marcação dos cDNAs alvos

Os cDNAs alvos foram marcados utilizando-se o kit AlkPhos Direct™ Labelling (GE Healthcare). O cDNA alvo (100 ng/µl, 10 µl) dos pontos controle, *pool* Início (24, 48 e 72h) e 30 e 60 dai, com três réplicas para cada ponto em cada variedade, foi desnaturado por 5 min a 99°C em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf), e logo em seguida incubado em gelo por 5 min. Foram adicionados para cada reação de marcação 10 µl do *reaction buffer*, 2 µl do *labelling reagent* e 10 µl da solução *cross-linker*. A reação foi incubada à 37°C por 30 min.

3.3. Pré-hibridação e hibridação das membranas de macroarranjo

As pré-hibridações, hibridações e lavagens das membranas foram realizadas de acordo com o protocolo proposto pelo kit AlkPhos Direct™ Detection System (GE Healthcare). As membranas de macroarranjos foram inicialmente tratadas com uma solução fervente de SDS 0,1% para diminuir o *background*.

As pré-hibridações foram realizadas em garrafas de vidro a 55°C por 40 min, utilizando 12 mL por membrana de solução AlkPhos Direct™ *hybridization buffer*, contendo 0,5 mol.L⁻¹ de NaCl e 4% de reagente de bloqueio. A hibridação foi realizada adicionando o cDNA alvo marcado na mesma solução utilizada na pré-hibridação. As membranas de macroarranjo foram hibridadas por um período de 16 h, a 55°C, em forno de hibridação digital (Fischer Scientific). Após esse período, as membranas foram lavadas.

3.4. Lavagem das membranas

Após a hibridação, procedeu-se à lavagem das membranas para a retirada do excesso de cDNA alvo e das hibridações inespecíficas que possivelmente tenham ocorrido. As membranas foram lavadas duas vezes, por períodos de 20 min, a 55°C, com 100 mL de tampão de lavagem primário (2 mol.L⁻¹ de uréia, 0,1% de SDS, 50 mmol.L⁻¹ de fosfato de sódio pH 7,0, 150 mmol.L⁻¹ de NaCl, 1 mmol.L⁻¹ de MgCl₂ e 0,2% de reagente de bloqueio). Em seguida, foram feitas duas lavagens de 10 min cada uma, a TA, com 100 mL de tampão secundário (50 mmol.L⁻¹ de Tris base, 100 mmol.L⁻¹ de NaCl e 2 mmol.L⁻¹ de MgCl₂). Em seguida, as membranas foram incubadas com CDP-STAR™ *detection reagent* (com cerca de 40 µl/cm²) por 5 min, a TA. Após a retirada do excesso do reagente de detecção, as membranas foram seladas em sacos plásticos para exposição em Hypercassette™ (Amersham), contendo uma folha de filme de autoradiografia Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare), por um período de 1 h 30 min. A revelação do filme procedeu-se imergindo-o por 1 min, sob agitação, em solução reveladora, seguida de imersão em H₂O por 30 s, imersão em solução fixadora por 1 min sob agitação, e depois os filmes foram lavados em água corrente e expostos ao ar para secagem. As imagens foram digitalizadas através do ImageScanner (Amersham) (Figura 7). A qualidade tridimensional dos *spots* foi verificada utilizando-se o programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare).

3.5. Recuperação das membranas após a hibridação

As membranas utilizadas em um experimento de hibridação tiveram os cDNAs alvo removidos, visando a reutilização das membranas. Para a remoção do cDNA alvo, as membranas foram lavadas duas vezes, por períodos de 15 min, com solução pré-aquecida a 65°C contendo 0,4 mol.L⁻¹ de NaOH e 0,1% de SDS. Em seguida, procedeu-se nova lavagem por duas vezes, a temperatura ambiente, com solução contendo 0,1% de SDS, 0,1% de SSC e 0,2 mol.L⁻¹ de Tris-HCl pH 8,0.

Após a recuperação das membranas, essas foram novamente lavadas com o CDP-STARTM *detection reagent* (com cerca de 40 µl/cm²), seladas em sacos plásticos e expostas em HypercassetteTM (Amersham) contendo uma folha de filme de autoradiografia HyperfilmTM ECL (GE Healthcare), por um período de 1 h 30 min, e não foi detectado nenhum sinal após a revelação.

3.6. Análise estatística das hibridações dos macroarranjos

A quantificação da intensidade do sinal representando o cDNA alvo hibridado foi feita utilizando-se o programa BZScan (LOPEZ et al., 2004) que utiliza algoritmos próprios para quantificação de imagens de arranjos em membranas de náilon. Cada *spot* foi determinado pelo posicionamento de um *grid* automático com ajustes manuais sobre a imagem do arranjo. O valor da intensidade foi determinado pelo algoritmo *Quant Fit Calculated* que: i) determina a subtração do *background* local sobre a intensidade de cada *spot*; ii) determina qualitativamente os spots não confiáveis (qualidade métrica - QM). Os dados obtidos foram transferidos para planilhas, onde foram convertidos em base logarítmica, normalizados e analisados estatisticamente. Os gráficos foram construídos utilizando os softwares GraphPad Prism 3.0 e Microsoft Excel 2007.

Os dados foram normalizados utilizando-se o método de normalização global baseado na subtração de um fator *c*, que é computado separadamente utilizando a média de cada ponto analisado em comparação à média do controle como descrito por Yang et al. (2002) comparando cada tempo inoculado com o controle (não inoculado). Os dados normalizados foram visualizados em gráficos de caixa (*box plot*) e em gráficos MA. Os gráficos MA representam a mudança na taxa de expressão [$M = \log_2(\textit{inoculado} / \textit{controle})$] dependentes da intensidade [$A = \log_2 \sqrt{(\textit{inoculado} \cdot \textit{controle})}$].

A taxa de expressão foi determinada para cada variedade com todos os pontos inoculados *versus* o controle, como também 60 dai e 30 dai *versus pool* Início e 60 dai *versus* 30 dai. Os valores de M menores que -1,5 ou maiores que 1,5 foram selecionados e foi empregada a análise estatística F. Os genes com significância estatística menor de 10% foram determinados e utilizados nas análises de perfil temporal da expressão gênica (agrupamento hierárquico completo), utilizando-se o programa Cluster, para gerar os agrupamentos, e o programa TreeView, para a visualização gráfica (EISEN et al., 1998).

Para os pontos Início, 30 dai e 60 dai foi determinada a taxa de expressão comparando TSH 1188 inoculado e Catongo inoculado para cada ponto. O teste F foi utilizado nos genes selecionados com o mesmo limiar estabelecido, determinando os genes com expressão estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

Os cDNAs alvos do *pool* Início (24, 48 e 72h) e 30 e 60 dai foram utilizados nos experimentos de perfil de expressão gênica nas variedades Catongo e TSH 1188, em comparação com as plantas controles (meristemas de ambas as variedades não inoculados). Para cada variedade foram feitas 12 hibridações independentes, com três repetições para cada tempo. A membrana do macroarranjo conteve 2855 produtos de PCR oriundos de duas bibliotecas de EST de meristemas de cacaueteiro infectados com *M. pernicioso* (GESTEIRA et al., 2007).

As imagens obtidas das hibridações foram digitalizadas (Figura 5) e transformadas em valores numéricos associados para cada *spot*. Nas imagens estão indicados os dois setores onde foram depositados em duplicata os produtos de PCR oriundos das bibliotecas TSH 1188 (1675 EST) e Catongo (1180 EST) inoculadas com *M. pernicioso*. Em cada setor verifica-se que não ocorreu hibridação nos controles internos, onde foram depositados DNA plasmidial contendo insertos de *Xantomonas*.

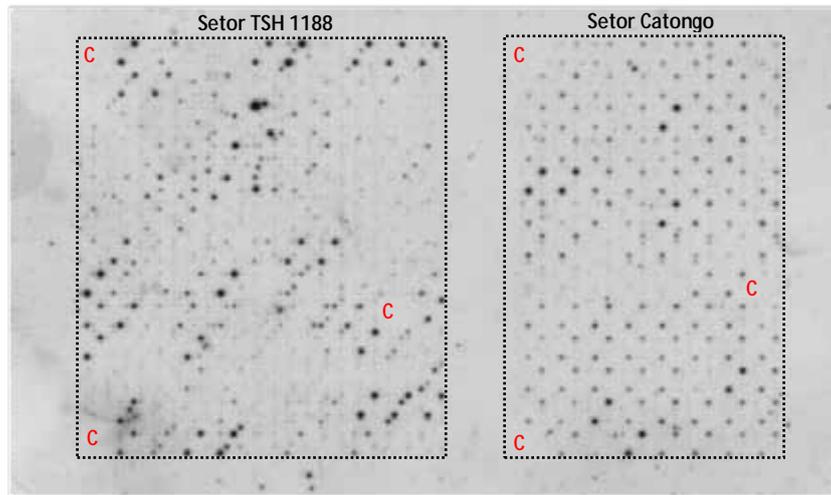


Figura 5: Auto-radiografia da membrana hibridada com cDNA alvo de Catongo 60 dai. Os setores TSH 1188 e Catongo e os controles internos (C) são mostrados.

A qualidade das duplicatas dos *spots* representando o mesmo EST pode ser visualizada na Figura 6. A análise dos *spots* pelo programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare) evidenciou a qualidade das réplicas dentro de cada arranjo com uma abordagem tridimensional, confirmando as observações a olho nu. Essa mesma constatação foi verificada pela quantificação da imagem pelo programa BZScan.

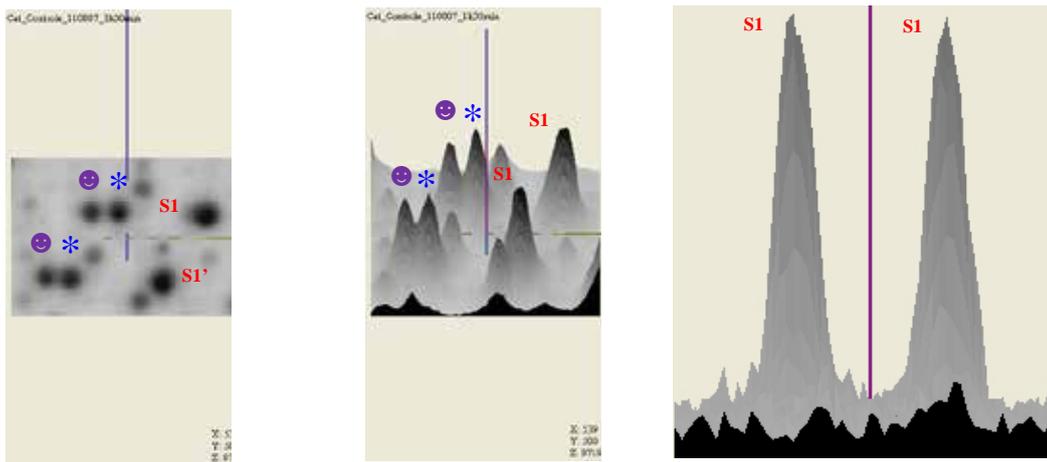


Figura 6: Visão tridimensional dos *spots* evidenciando a qualidade das repetições dentro da membrana. Imagens obtidas pelo programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare). Os spots representados por S1, * e ☺ são indicados com as suas réplicas.

Após a normalização dos dados, foi determinada a taxa de expressão dentro de cada variedade e também entre a variedade resistente e suscetível nos diferentes tempos após a inoculação. A Figura 7 mostra o gráfico em caixa (*box plot*) da distribuição dos valores de M antes e após a normalização para ambas as variedades.

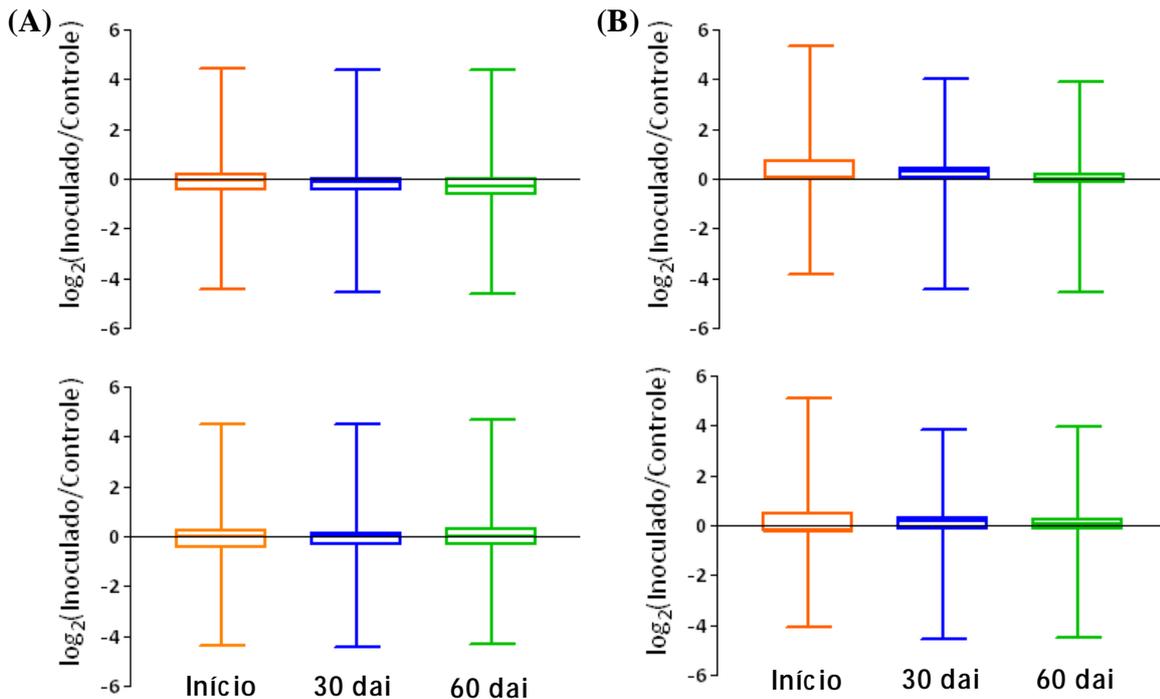


Figura 7: Os gráficos em caixa representando a distribuição dos dados da razão dos \log_2 antes e após a normalização em comparação ao controle. (A) variedade Catongo antes (a cima) e após (em baixo) a normalização. (B) variedade TSH 1188 antes (a cima) e após (em baixo) a normalização. Em laranja, azul e verde são representados os dados do *pool* Início (24 h, 48 h e 72 h), de 30 dai e de 60 dai, respectivamente.

Os dados normalizados foram também visualizados em gráficos MA (Figura 8) o que permitiu a identificação visual dos genes que apresentaram mudanças na taxa de expressão menores que -1,5 ou maiores que 1,5 para ambas as variedades testadas nos três tempos estudados. Para os genes identificados com a linha de corte (*threshold*) estabelecida foi empregada a estatística F sendo encontrados 112 genes, na variedade Catongo, e 78 genes, em TSH 1188, com valor $P < 0,1$ (Tabelas 1 e 2 respectivamente).

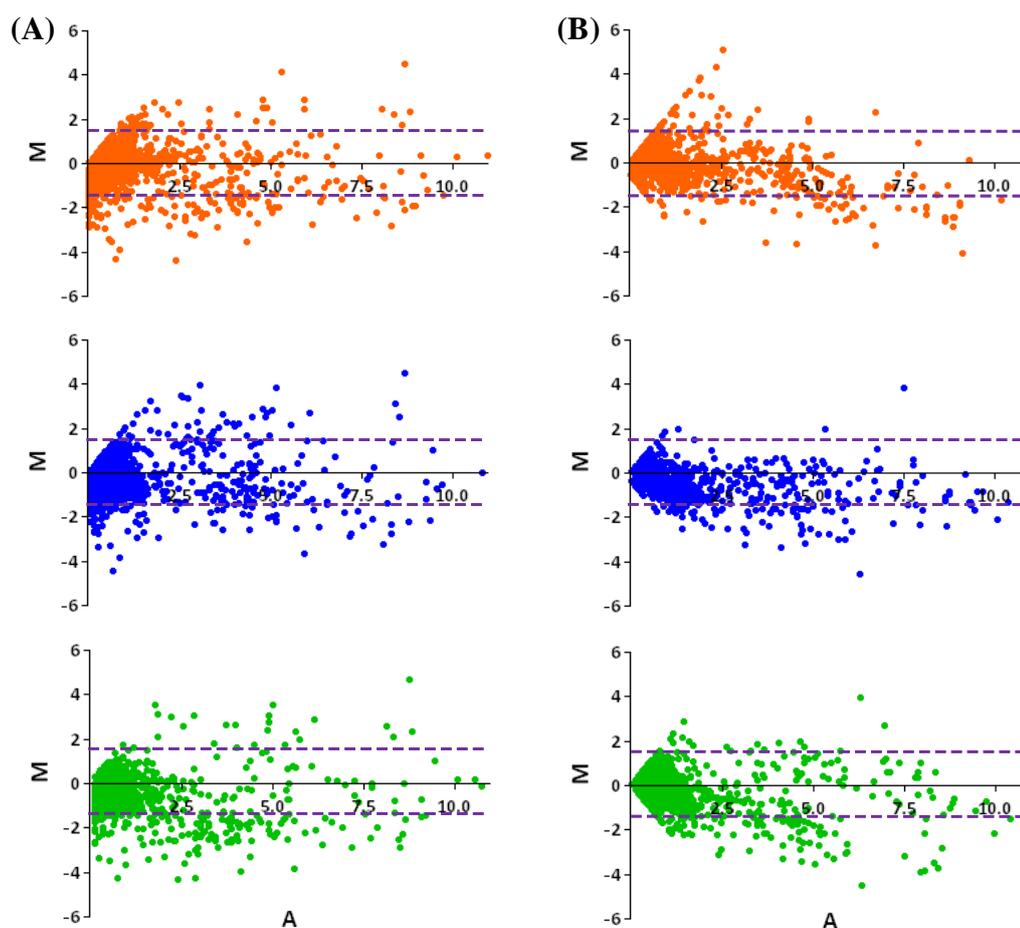


Figura 8: Distribuição dos dados normalizados da variedade Catongo e TSH 1188 usando os gráficos MA. $M = \log_2(\text{inoculado} / \text{controle})$ e $A = \log_2 \sqrt{(\text{inoculado} / \text{controle})}$ (A) variedade Catongo e (B) variedade TSH 1188. Em laranja, azul e verde são representados os dados do pool Início (24 h, 48 h e 72 h), de 30 dai e de 60 dai, respectivamente.

Entre os 112 genes diferentemente expressos estatisticamente significantes em Catongo, 53 transcritos induzidos e 68 reprimidos. Nove genes obtiveram mudanças na taxa de expressão comum, se comportando tanto como induzidos quanto reprimidos nos períodos estudados. Entre esses transcritos induzidos, 16 foram detectados apenas no Início, 29 apenas em 30 dai, 8 apenas em 60 dai e 1 comum entre 30 e 60 dai quando comparados os meristemas infectados e os não infectados (Figura 9A). Para os genes reprimidos, 11 foram detectados apenas no Início, 15 apenas em 30 dai, 27 apenas em 60 dai, 5 em ambos Início e 30 dai, 5 em ambos Início e 60 dai, 3 em ambos 30 e 60 dai e 2 em todos os três pontos (Figura 9B).

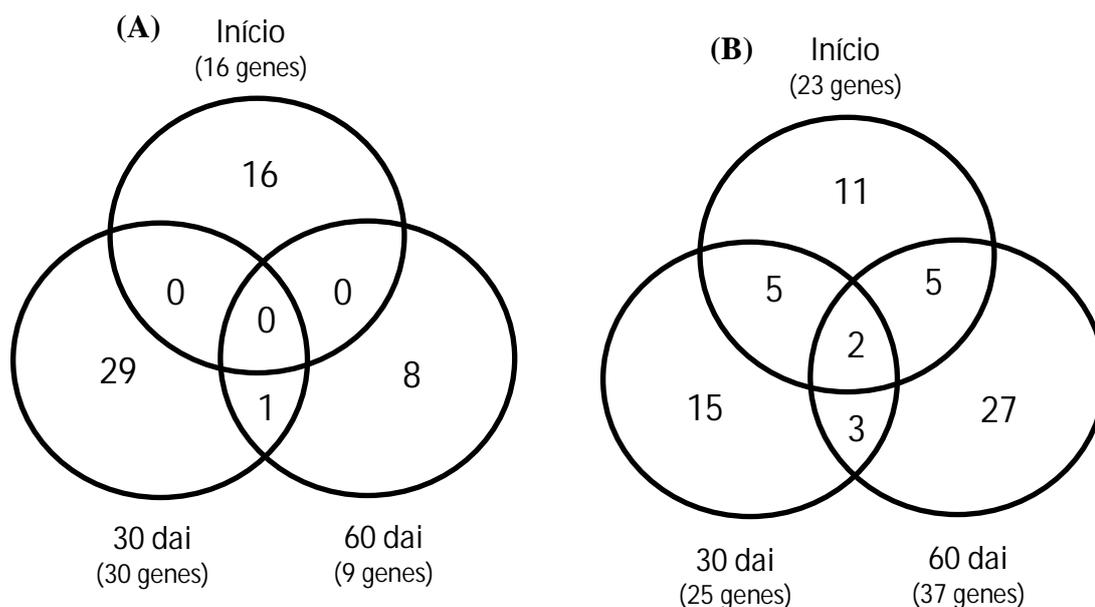


Figura 9: Diagrama de Venn representando os 112 genes diferentemente expressos da variedade Catongo com aumento no nível de transcritos (A) e diminuição no nível de transcritos (B) nos três diferentes estágios estudados. Os números representam o total de genes em um particular tempo.

Na variedade TSH 1188 foram detectados 78 genes exibindo mudanças de transcritos significantes estatisticamente, sendo 25 induzidos, 61 reprimidos e 8 comuns entre ambos os conjuntos. Entre esses transcritos induzidos, 7 foram detectados apenas no Início, 4 apenas em 30 dai, e 14 apenas em 60 dai (Figura 10A). Entre os genes reprimidos, 5 foram detectados apenas no Início, 5 apenas em 30 dai, 40 apenas em 60 dai, 10 em ambos 30 e 60 dai e 1 em todos os três pontos analisados (Figura 10B).

Entre os genes identificados com aumento na abundância dos transcritos na variedade Catongo, 22% correspondem a proteínas de função desconhecida, 18% a proteínas sem homologia, 17% a síntese e processamento de proteínas, 11% a metabolismo primário, 6% na síntese de parede celular, 5% a expressão gênica, 5% a metabolismo do DNA, 4% a tradução de sinal, 4% a estímulo abiótico, e os outros 6% foram divididos entre metabolismo secundário, miscelâneas e tráfegos de vesículas (Figura 11A).

Para os genes com diminuição em abundância, o maior grupo (38%) foi envolvido na síntese e no processamento de proteínas e o segundo maior grupo (24%) em proteínas sem homologia, seguido de proteínas com função desconhecidas (19%). Outras categorias encontradas foram envolvidas em metabolismo primário (6%), metabolismo do DNA (4%),

estímulo abiótico (3%), expressão gênica (2%), defesa e resgate celular (2%), parede celular (1%) e transporte de membranas (1%) (Figura 11B).

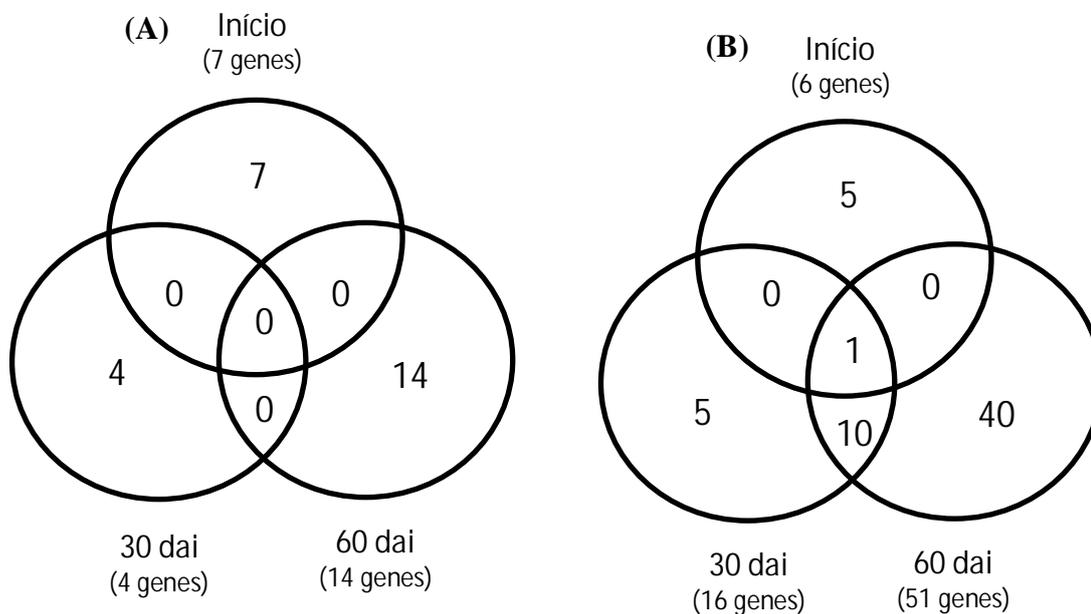


Figura 5: Diagrama de Venn representando os 78 genes diferentemente expressos da variedade TSH 1188 com aumento no nível de transcritos (A) e diminuição no nível de transcritos (B) nos três diferentes estágios após inoculados estudados. Os números representam o total de genes em um particular tempo.

Na variedade TSH 1188, os genes induzidos foram agrupados em proteínas sem homologia (36%), função desconhecida (20%), síntese e processamento de proteínas (16%), expressão gênica (8%), transporte de membranas (4%), estímulo abiótico (4%), miscelâneas (4%), metabolismos primário (4%) e secundário (4%) (Figura 12A).

Os genes reprimidos em TSH 1188 foram agrupados funcionalmente sendo que 52% foram envolvidos em síntese e processamento de proteínas, 20% em genes sem homologia, 8% em metabolismo primário, 8% em função desconhecida, 3% na síntese de parede celular, 2% em metabolismo secundário, 2% em transporte de membranas, 2% em defesa e resgate celular, 2% em tradução de sinal e 1% em ciclo celular (Figura 12B).

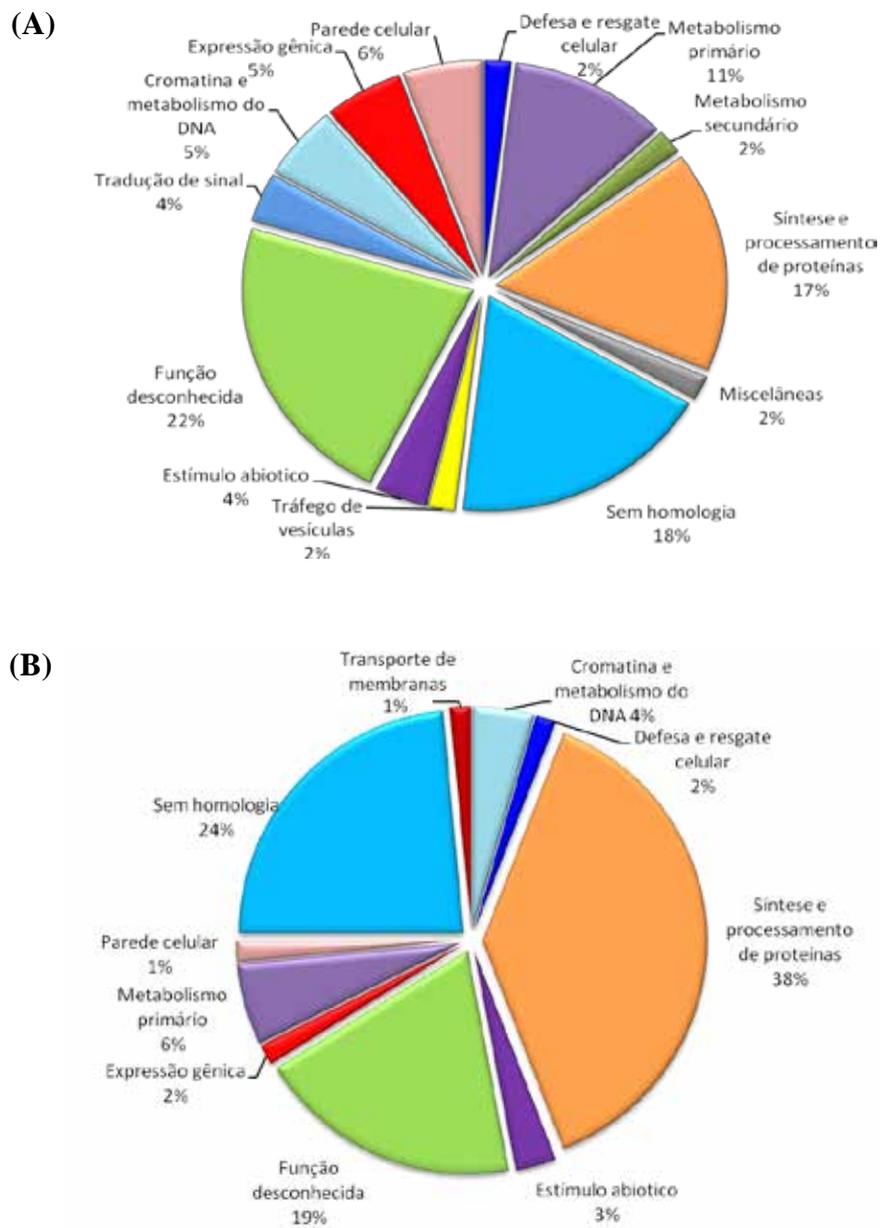


Figura 6: Classificação funcional dos 112 genes diferentemente expressos na variedade Catongo seguindo a anotação das bibliotecas utilizada por Gesteira et al. (2007). (A) Genes induzidos e (B) Genes reprimidos.

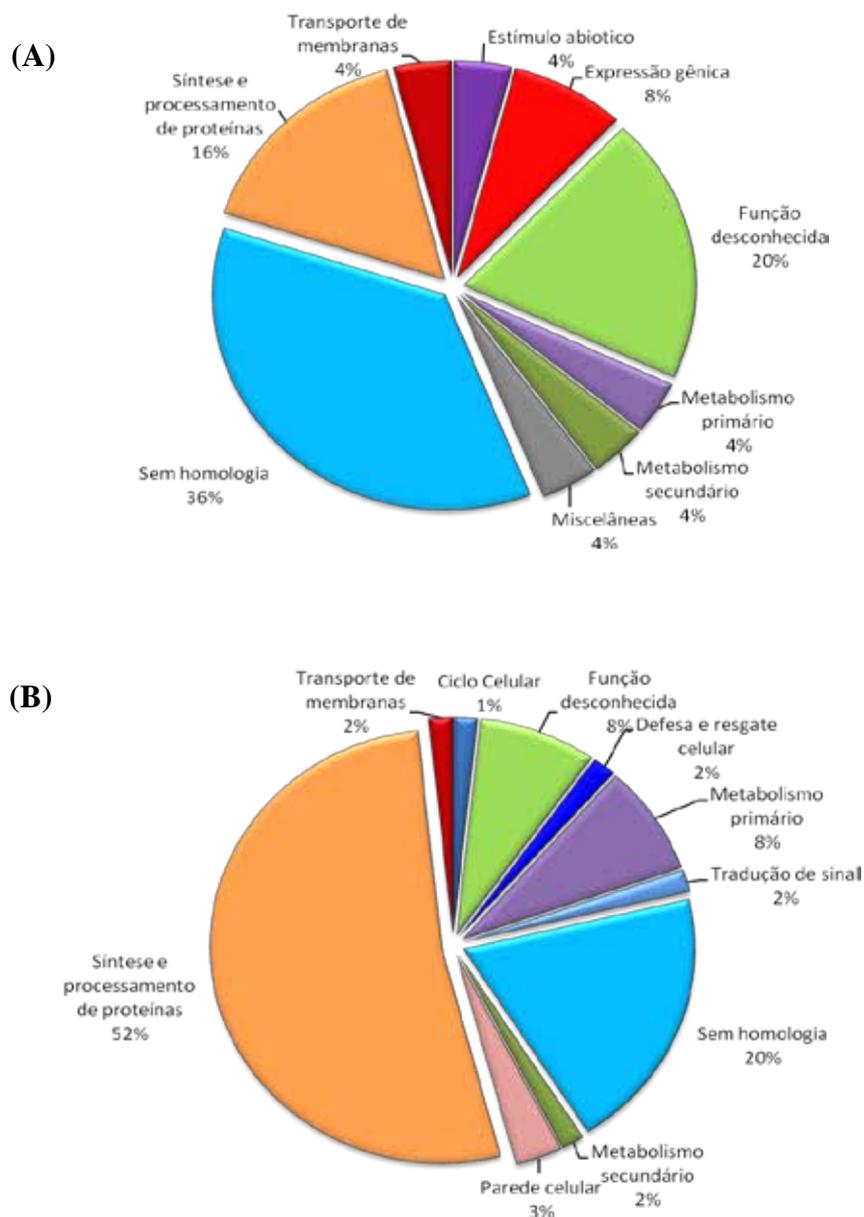


Figura 7: Classificação funcional dos 78 genes diferentemente expressos na variedade TSH 1188 seguindo a anotação das bibliotecas utilizada por Gesteira et al. (2007). (A) Genes induzidos e (B) Genes reprimidos.

Para a análise de agrupamento do perfil temporal de expressão dos genes foi realizado o método supervisionado, que utiliza os valores estatisticamente significantes dos transcritos como vetores de referência para a construção do agrupamento hierárquico completo em ambas as variedades. Os 112 genes identificados em Catongo que foram regulados positiva e

negativamente formaram seis maiores padrões de expressão (I a VI), que são visualizados na Figura 13. A representação gráfica dos perfis são mostrados na Figura 16.

O perfil do grupo I apresenta genes que são mais expressos no controle (não inoculado) e obtêm uma diminuição na taxa de expressão pronunciada quando a planta está inoculada pelo fungo (Figura 13 e 14). Como verificado na Tabela 1, nove genes pertencentes ao grupo I são envolvidos na síntese e processamento de proteínas, cinco genes em proteínas com função desconhecida, dois genes em proteínas sem homologia e um gene em metabolismo primário. Se destacam nesse grupo os genes *nad1* (NADH desidrogenase subunidade 1), protease VPE (vacuolar processing enzyme-1), ADP-ribose-1 monofosfato (Appr-1-p), as chaperonas proteína de ligação ao c-myc e DNAJ e genes envolvidos nos processos de iniciação da tradução.

O perfil do grupo II é formado por genes que são induzidos apenas no Início, voltando ao mesmo estado do controle em 30 e 60 dai (Figura 13 e 14). Formam esse grupo dois genes envolvidos em cromatina e metabolismo do DNA, um gene em expressão gênica, dois genes com função desconhecidas, um gene em transdução de sinal, dois genes em metabolismo primário, um gene em transporte de membranas, um gene em miscelâneas, um gene em estímulo abiótico, dois genes em parede celular, cinco genes sem homologia e três genes em síntese e processamento de proteínas (Tabela 1). Compõem o grupo II os genes das proteínas supressora de cinetocoro 1 (*Skp1*), cisteína protease tipo OTU, proteína de choque térmico, endoquitinase, percussor da proteína rica em prolina, desidrogenase, oxidoreductase, fosfatase tipo 2C, proteína da fibra (*Fb11*), proteína dedo de zinco com o domínio POZ e a proteína de reparo de DNA (*RAD23*).

Os genes do grupo III são induzidos em 30 dai e retornam a expressão basal em 60 dai assim como estavam no controle e no Início (Figura 13 e 14). Compõem o grupo III seis genes sem homologia, um gene em defesa e resgate celular, seis genes em função desconhecida, um gene em estímulo abiótico, um gene em tráfego de vesículas, quatro genes em metabolismo primário, um gene metabolismo secundário, um gene em parede celular e um gene em síntese e processamento de proteínas (Tabela 1). Ganham destaque inibidor de proteossomo, glicoproteína rica em hidroxiprolina, sintase de alfa-terpineol, proteína GH3 responsivo a auxina e proteína relacionada a patogêneses 4 (*PR4b*).

O grupo IV é formado por genes que apresentam uma pequena repressão no Início seguido por um aumento de expressão apenas em 30 dai (Figura 13 e 14). São identificados nesse grupo três genes envolvidos em síntese e processamento de proteínas (destacando-se proteossomo 26S e percussor da proteína dissulfito isomerase), quatro genes sem homologia,

quatro genes com função desconhecida, um gene envolvido em expressão gênica (regulador de transcrição não-senso) e um gene em cromatina. O grupo V é muito parecido com o grupo IV, mas apresentam uma forte repressão no Início seguido por uma indução apenas em 30 dai. Compõem o esse grupo um gene envolvido em cromatina, um gene em defesa e resgate celular (PCD4), um gene com função desconhecida, um gene de estímulo abiótico (proteína contendo o domínio DC1), um gene em parede celular, três genes em metabolismo primário (ATP synthase CF0, proteína de ligação a clorofila a/b e citocromo oxidase c), cinco genes sem homologia e seis genes envolvidos em síntese e processamento de proteínas (proteína de choque térmico DNAJ, serina carboxipeptidase S10, proteína dedo de zinco contendo o domínio RING, enzima de conjugação a ubiquitina E2 e proteína contendo o domínio SAM).

O grupo VI é formado por genes que aumentam em expressão apenas em 60 dai (Figura 13 e 14). Como verificado na Tabela 1 esse grupo é formado por oito genes, sendo dois genes sem homologia, um gene em cromatina e metabolismo do DNA (fosfoproteína nuclear), um gene em expressão gênica (homeodomínio HB2), três genes com função desconhecida e um gene em transdução de sinal (proteína MRG).

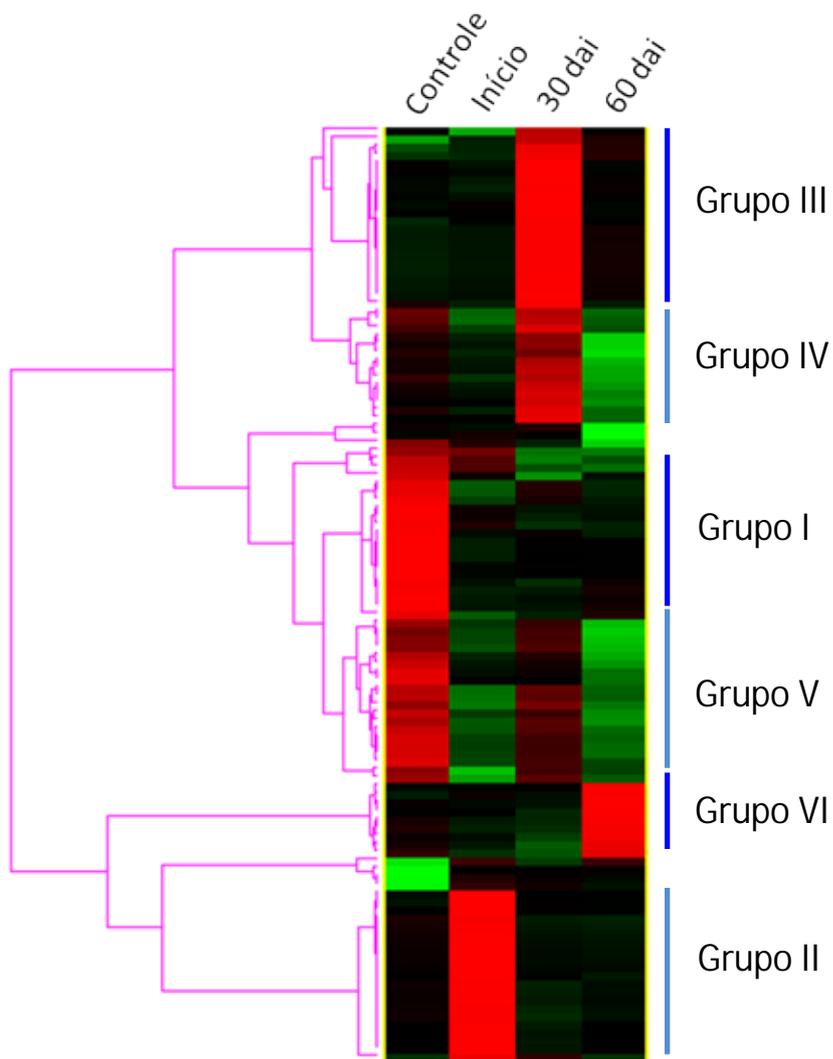


Figura 8: Agrupamento hierárquico mostrando o perfil de expressão gênica temporal na variedade Catongo com os 112 genes estatisticamente significantes. A cor vermelha indica aumento da expressão, a cor verde indica diminuição da expressão e a cor preta nenhuma mudança no nível dos transcritos.

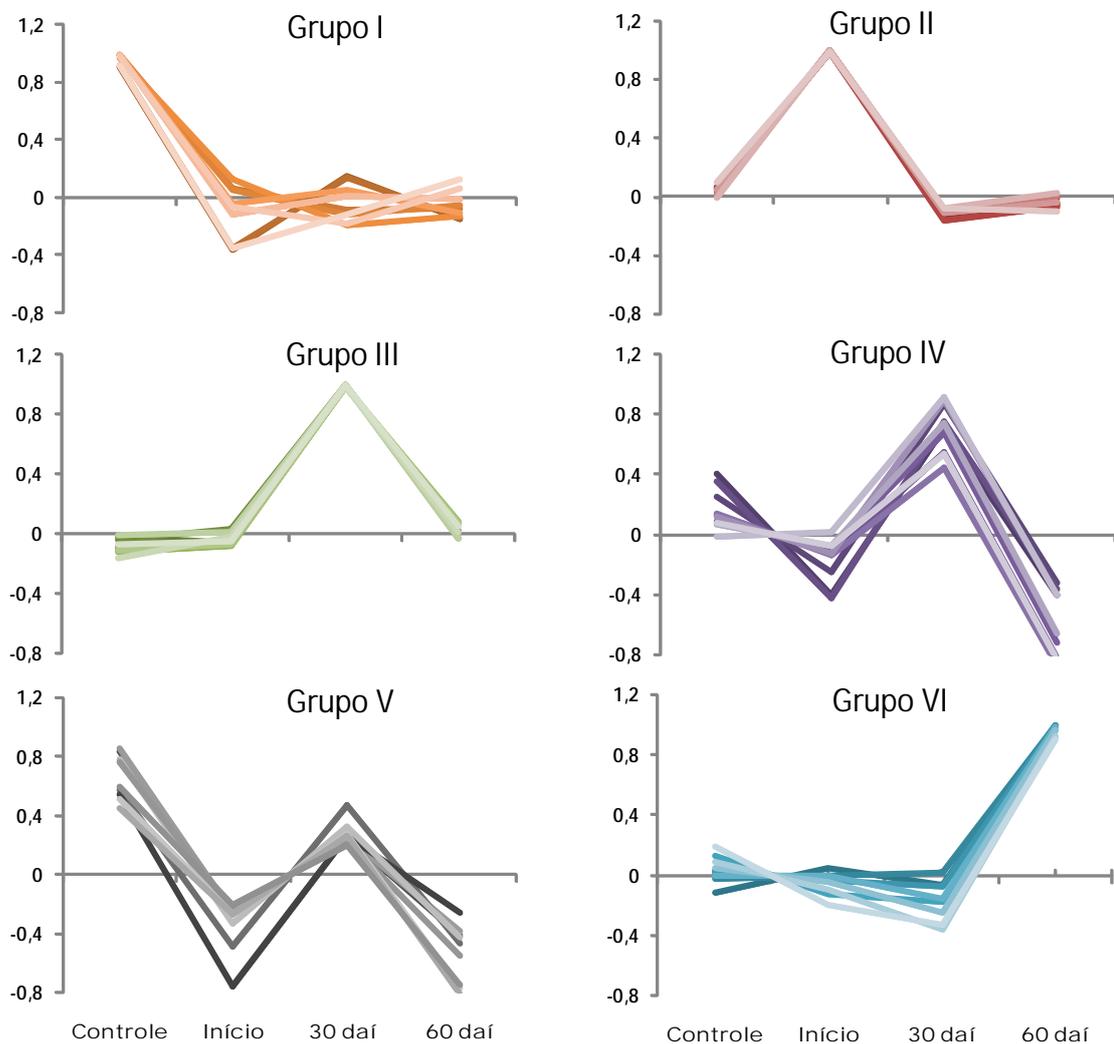


Figura 9: Representação gráfica dos perfis dos seis principais grupos observados no agrupamento hierárquico da variedade Catongo.

Os 78 genes que foram induzidos e/ou reprimidos em TSH 1188 também formaram seis maiores padrões de expressão (I a VI) que são visualizados na Figura 15 e a representação gráfica dos perfis são verificados na Figura 16.

O perfil do grupo I apresenta genes que estão expressos no controle (não inoculado) e apresentam uma diminuição na taxa de expressão quando a planta é inoculada pelo fungo (Figura 15 e 16). Como verificado na Tabela 2, dos 20 genes pertencentes ao grupo I, 14 estão envolvidos na síntese e processamento de proteínas (destacando-se enzima de conjugação de ubiquitina E2, ubiquitina, inibidor de proteossomo, inibidor de protease, proteína de

transferência de lipídios e proteína F-box). Além desses, são encontrados quatro genes sem homologia e dois genes envolvidos no metabolismo primário (desidrogenase e tioredoxina H-1)

O grupo II é formado por genes que sofrem uma pequena repressão no Início seguido por uma forte repressão em 30 e 60 dai (Figura 15 e 16). A grande maioria (11 genes) estão envolvidos em síntese e processamento de proteínas (destacando-se proteína dedo de zinco com domínio RING-H2, proteína de choque térmico DNAJ, ciclofilina, subunidades alfa e beta de proteossomos e proteína de ligação ao cobre), seguidos por um gene sem homologia, um gene em parede celular e um gene em ciclo celular (Tabela 2).

Os genes do grupo III são induzidos no Início e sofrem uma forte repressão em 60 dai (Figura 15 e 16). Compõe o grupo III um gene sem homologia, um gene em função desconhecida, um gene envolvido em metabolismo primário e seis genes em síntese e processamento de proteínas (Tabela 2). Ganham destaque peptidil-prolil cis-trans isomerase (ciclofilina), proteína de semente de 21 kDa (inibidor de tripsina) e NADH desidrogenase.

O grupo IV é formado por genes que são induzidos apenas no Início, voltando ao mesmo estado do controle em 30 e 60 dai (Figura 15 e 16). Como mostrado na Tabela 2 são identificados nesse grupo um gene envolvido em síntese e processamento de proteínas, quatro genes sem homologia, quatro genes com função desconhecida, um gene envolvido em defesa e resgate celular (proteína de resistência do grupo 2), dois genes em metabolismo primário (citocromo oxidase subunidade 2 e desidratase), um gene em parede celular (glicoproteína rica em hidroxiprolina), um gene em transporte de membranas e um gene em transdução de sinal (calcineurina B).

O grupo V apresenta uma forte repressão no Início, voltando ao mesmo estado do controle em 30 e 60 daí (Figura 15 e 16). Compõem esse grupo dois gene com função desconhecida, cinco sem homologia, um gene envolvido em metabolismo primário (proteína de ligação a clorofila a/b), um gene em metabolismo secundário (polifenol oxidase) e um gene em síntese e processamento de proteínas (proteína da família F-box) (Tabela 2).

O grupo VI é formado por genes que aumentam seu nível de expressão apenas em 60 dai (Figura 15 e 16). Como verificado na Tabela 2 esse grupo é formado por três genes sem homologia, dois genes envolvidos em expressão gênica (proteínas dedo de zinco), um gene em síntese e processamento de proteínas, um gene em função desconhecida, um gene em transporte de membrana (purina permease), um gene em estímulo abiótico (LEA) e um gene em miscelâneas (lipoxigenase).

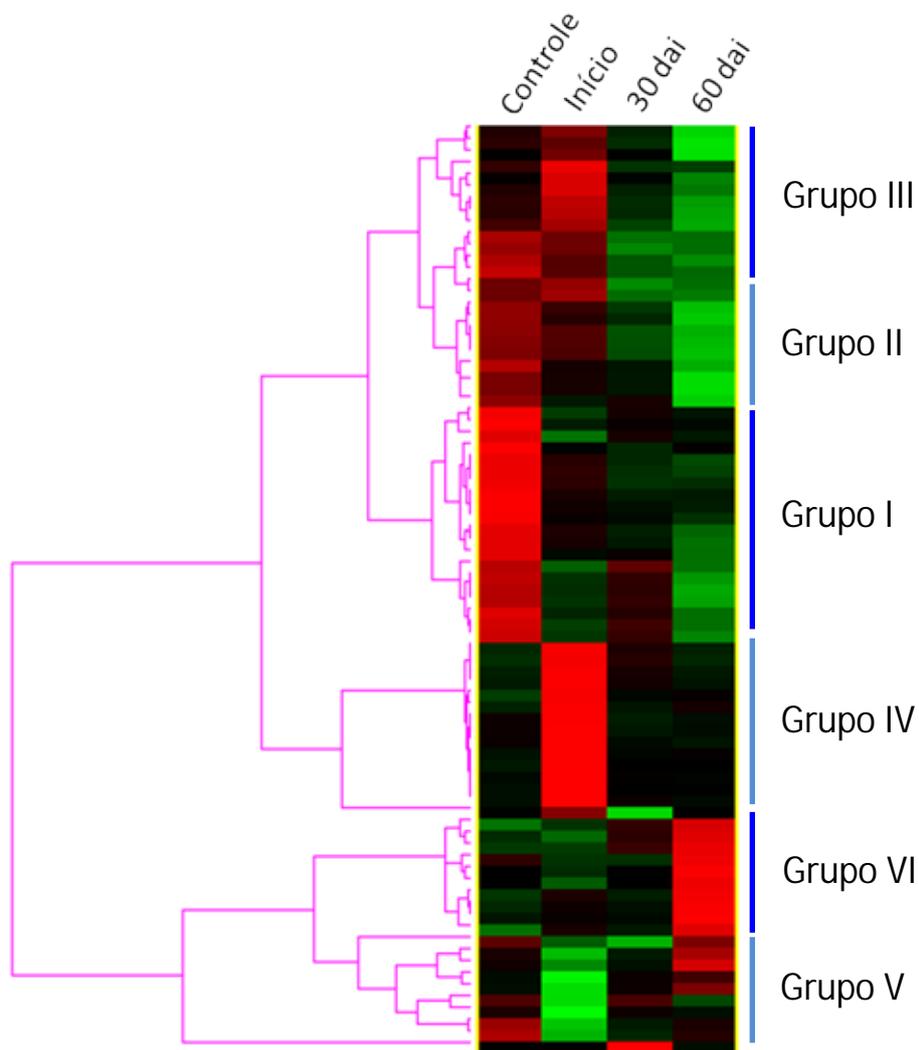


Figura 10: Agrupamento hierárquico mostrando o perfil de expressão gênica temporal na variedade TSH 1188 com os 78 genes estatisticamente significantes. A cor vermelha indica aumento da expressão, a cor verde indica diminuição da expressão e a cor preta nenhuma mudança no nível dos transcritos.

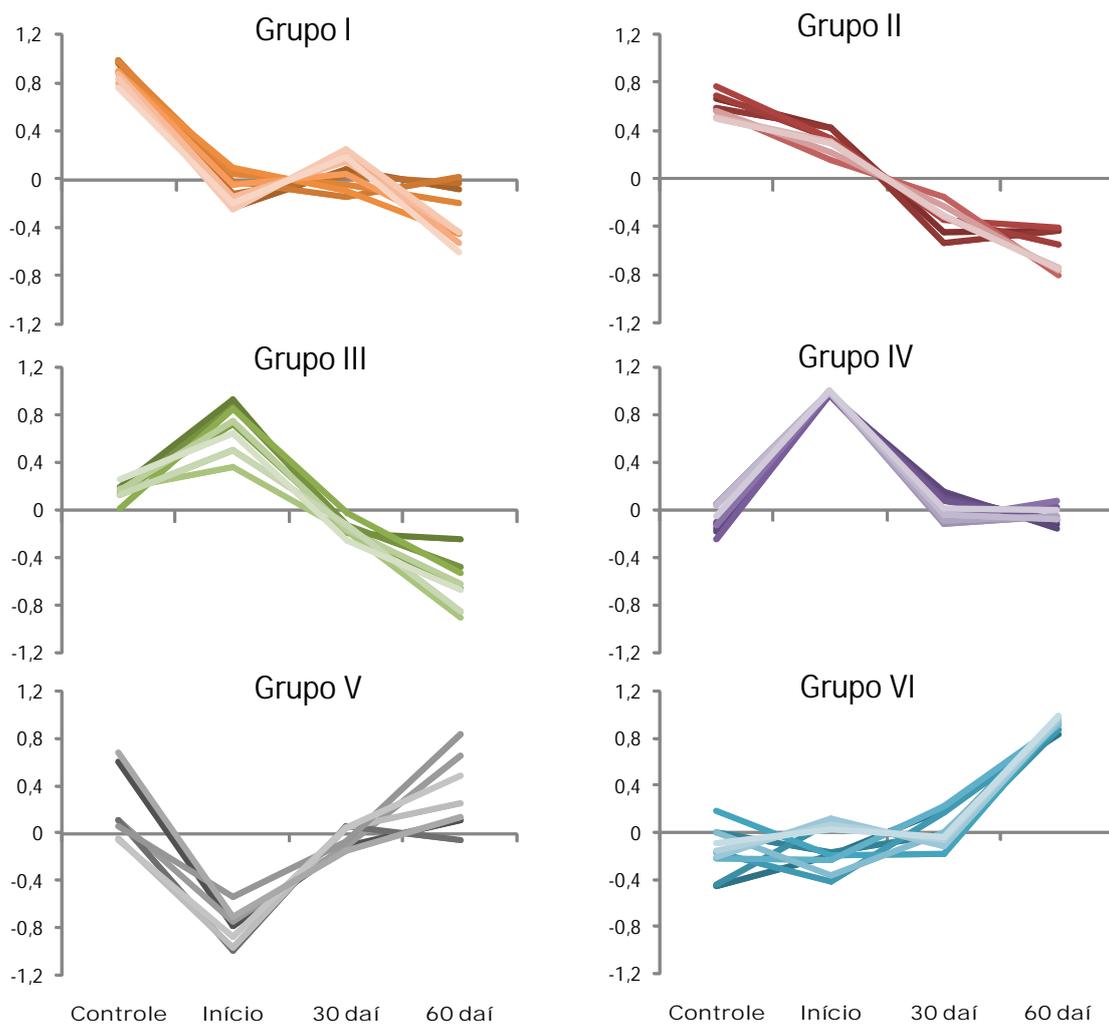


Figura 11: Representação gráfica dos perfis dos seis principais grupos observados no agrupamento hierárquico da variedade TSH 1188.

A comparação entre a resposta da planta resistente e a suscetível ao ataque do patógeno, nos tempos Início, 30 e 60 dai, foi aplicada aos dados normalizados. Verificando a taxa de expressão e a significância estatística dos genes de TSH 1188 e Catongo foram identificados 62 genes diferentemente expressos entre essas variedades (Tabela 3).

No tempo Início, os genes mais induzidos em TSH 1188 em comparação a Catongo foram uma citocromo oxidase, proteína de resistência do grupo 2, ciclofilina, NADH desidrogenase, glicoproteína rica em hidroxiprolina, as chaperonas proteína de ligação a c-myc e proteína KE2, calcineurina B, seis genes com função desconhecida, quatro genes sem homologia. Em Catongo são encontrados induzidos um gene com função desconhecida, um sem homologia e a beta glucosidase.

Com a progressão da doença, em 30 dai são identificados genes mais expressos em Catongo, como ciclofilina, glicoproteína rica em hidroxiprolina e LEA. Em 60 dai são identificados os genes que codificam as proteínas MRG, proteína dissulfito isomerase (PDI), fosfoproteína nuclear, três genes sem homologia e um com função desconhecida, se destacando em Catongo e genes que codificam proteossomo 26S, proteína F-box, proteína contendo o domínio SAM em TSH 1188.

Tabela 1: Lista dos 112 genes diferentemente expressos na variedade Catongo. A classificação funcional, a taxa de mudança, a significância estatística e o perfil de expressão no agrupamento hierárquico são mostrados.

Provável Função	Seqüência	Início vs Controle	30 dai vs Controle	60 dai vs Controle	30 dai vs Início	60 dai vs Início	60 dai vs 30 dai	Perfil de expressão
Cromatina e metabolismo do DNA								
DNA repair protein RAD23	UE-BINT-RT-001-053.F.G07	1,55			-1,72			II
Histone H2A	UE-BINT-RT-001-052.F.G05				-1,57			II
Histone H4	UE-BINT-RT-001-001.F.D04				1,77			IV
F6F3.17 protein (Similar to histone H3)	UE-BINT-RT-001-002.F.D10	-1,52		-2,56				V
Acidic nuclear phosphoprotein	UE-BINT-RT-001-017.F.D01					2,22	2,48	VI
Defesa e resgate celular								
Pathogenesis-related protein PR-4B	UE-BINT-SP-001-021.F.F06				1,5			III
Programmed cell death 4	UE-BINT-RT-001-026.F.B07			-1,78				V
Expressão gênica								
Putative zinc finger POZ domain protein	UE-BINT-RT-001-059.F.F01	1,69			-2,02			II
Regulator of nonsense transcripts	UE-BINT-RT-001-001.F.E10				1,69			IV
HB2 homeodomain protein	UE-BINT-RT-001-026.F.F08			1,97				VI
Função desconhecida								
Arabidopsis thaliana clone T17M13	UE-BINT-SP-001-025.F.F02	-1,60	-1,59					I
Expressed protein	UE-BINT-SP-001-041.F.A02	-2,23						I
Expressed protein	UE-BINT-RT-001-059.F.A10	-1,62		-1,72				I
Hypothetical protein	UE-BINT-RT-001-025.F.B11	-1,5	-2,07	-1,96				I
Unknown	UE-BINT-SP-001-008.F.D04	-2,38						I
Hypothetical mitochondrial protein	UE-BINT-RT-001-001.F.B03			-1,58				II
Mus musculus clone RP24-300F2	UE-BINT-RT-001-009.F.D06	2,77			-2,95			II
Unnamed protein	UE-BINT-RT-001-042.F.B06	1,89			-2,06			II
Expressed protein (AT4g30780)	UE-BINT-RT-001-008.F.G03				1,55			III
Hypothetical protein	UE-BINT-RT-001-010.F.G02				2,41			III
Mus musculus clone RP24-237I4	UE-BINT-RT-001-002.F.A09	-1,86			1,68			III
Mus musculus clone RP24-302F18	UE-BINT-RT-001-046.F.F12				1,5			III
OSJNBa0006A01.2	UE-BINT-SP-001-025.F.C02				2,63			III
Unknown protein	UE-BINT-RT-001-025.F.C03				1,66			III

Continuação da **Tabela 1:**

Provável Função	Seqüência	Início vs Controle	30 dai vs Controle	60 dai vs Controle	30 dai vs Início	60 dai vs Início	60 dai vs 30 dai	Perfil de expressão
Expressed protein	UE-BINT-RT-001-060.F.C10						-2,14	IV
Hypothetical protein P0408G07.5	UE-BINT-RT-001-001.F.E05				2,26		-2,14	IV
Unnamed protein	UE-BINT-RT-001-012.F.A02						-2,1	IV
Unnamed protein	UE-BINT-RT-001-046.F.F05						-2,55	IV
Unnamed protein	UE-BINT-RT-001-001.F.B05	-1,78		-1,93				V
At1g61040/T7P117	UE-BINT-RT-001-006.F.G02			2,99			3,46	VI
Expressed protein	UE-BINT-RT-001-003.F.G09						3,57	VI
Sadtomato protein	UE-BINT-RT-001-029.F.H10					2,96	3,75	VI
Estímulo abiótico								
Fiber protein (Fb11)	UE-BINT-RT-001-009.F.C01	2,02			-1,99			II
Auxin-responsive GH3 family protein	UE-BINT-SP-001-025.F.G07				1,78			III
DC1 domain-containing protein	UE-BINT-RT-001-026.F.D11			-1,94				V
Transdução de sinal								
Phosphatase type 2C	UE-BINT-RT-001-016.F.A12	1,93						II
MRG family protein	UE-BINT-RT-001-009.F.F02					3,48		VI
Tráfego de vesículas								
RabGAP/TBC domain-containing protein	UE-BINT-RT-001-002.F.C08				2,89			III
Metabolismo primário								
A.thaliana mitochondrial nad1 gene	UE-BINT-RT-001-060.F.D04	-2,49						I
Dehydrogenase	UE-BINT-RT-001-047.F.F04	2,19						II
Oxidoreductase	UE-BINT-RT-001-002.F.H08	2,11						II
Apocytochrome f precursor	UE-BINT-RT-001-007.F.E06				3,18			III
Carboxyl transferase alpha subunit	UE-BINT-RT-001-012.F.G05				1,66			III
Phosphoglucomutase	UE-BINT-RT-001-058.F.F10				2,58			III
Photosystem I reaction center subunit VI	UE-BINT-SP-001-036.F.H06				1,53			III
ATP synthase CF0 B	UE-BINT-RT-001-025.F.B09		-1,67	-3,6				V
Chlorophyll A-B binding protein	UE-BINT-RT-001-001.F.F04			-2,63				V
Cytochrome c oxidase	UE-BINT-RT-001-004.F.D02			-2,01				V

Continuação da **Tabela 1:**

Provável Função	Seqüência	Início vs Controle	30 dai vs Controle	60 dai vs Controle	30 dai vs Início	60 dai vs Início	60 dai vs 30 dai	Perfil de expressão
Metabolismo secundário								
Alpha-terpineol synthase	UE-BINT-RT-001-028.F.A09				1,68			III
Transporte de membranas								
Integral membrane transporter protein	UE-BINT-RT-001-059.F.G06				-2,21	-2,05		II
Miscelâneas								
Glycine-rich protein	UE-BINT-RT-001-013.F.E10	1,56						II
Parede celular								
Endochitinase 1	UE-BINT-RT-001-047.F.B02	1,50						II
Proline-rich protein precursor	UE-BINT-RT-001-016.F.F01	2,55						II
Hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	UE-BINT-RT-001-015.F.G02				1,71			III
Glycosyl hydrolase family 38 protein	UE-BINT-RT-001-025.F.E03			-3,92			-2,0	V
Sem Homologia								
No-Hit	UE-BINT-RT-001-025.F.F08	-2,47						I
No-Hit	UE-BINT-RT-001-026.F.D09	-2,2		-1,83				I
No-Hit	UE-BINT-RT-001-030.F.C05	1,73						II
No-Hit	UE-BINT-RT-001-028.F.H08				-1,73	-1,57		II
No-Hit	UE-BINT-RT-001-006.F.B03	2,08			-2,25			II
No-Hit	UE-BINT-RT-001-029.F.C02				-2,45			II
No-Hit	UE-BINT-RT-001-042.F.E01				-2,21			II
No-Hit	UE-BINT-RT-001-004.F.G11				1,63			III
No-Hit	UE-BINT-RT-001-001.F.F08				2,19			III
No-Hit	UE-BINT-RT-001-001.F.G08						-1,76	III
No-Hit	UE-BINT-RT-001-028.F.C02				1,99			III
No-Hit	UE-BINT-SP-001-025.F.G08				1,55			III
No-Hit	UE-BINT-SP-001-041.F.F10				1,93			III
No-Hit	UE-BINT-RT-001-001.F.F02						-2,49	IV
No-Hit	UE-BINT-RT-001-010.F.H12						-2,46	IV
No-Hit	UE-BINT-RT-001-046.F.A02						-1,52	IV

Continuação da **Tabela 1:**

Provável Função	Seqüência	Início vs Controle	30 dai vs Controle	60 dai vs Controle	30 dai vs Início	60 dai vs Início	60 dai vs 30 dai	Perfil de expressão
No-Hit	UE-BINT-RT-001-002.F.F07				1,94		-2,06	IV
No-Hit	UE-BINT-RT-001-001.F.F11			-2,60				V
No-Hit	UE-BINT-RT-001-002.F.B04			-2,18				V
No-Hit	UE-BINT-RT-001-002.F.C03		-2,27					V
No-Hit	UE-BINT-RT-001-025.F.C12	-2,25		-1,72				V
No-Hit	UE-BINT-RT-001-002.F.G12	-1,95		-2,28				V
No-Hit	UE-BINT-RT-001-042.F.H03			2,09		2,74		VI
No-Hit	UE-BINT-RT-001-047.F.H11			1,65		1,76	1,83	VI
Síntese e processamento de proteínas								
21 kDa seed protein	UE-BINT-RT-001-002.F.E01		-2,35					I
60S ribosomal protein L31	UE-BINT-RT-001-004.F.B09					-2,95	-2,81	I
Eukaryotic translation initiation factor 3	UE-BINT-RT-001-050.F.F12						-1,76	I
RING3 protein	UE-BINT-RT-001-046.F.C11		-1,76	-1,95				I
trnT-trnL intergenic spacer	UE-BINT-RT-001-017.F.F10			-2,49				I
Ubiquitin family protein	UE-BINT-SP-001-033.F.H05		-2,21					I
40S ribosomal protein S23	UE-BINT-SP-001-051.F.F07	-1,84						I
60S ribosomal protein L144	UE-BINT-SP-001-061.F.F06	-2,39	-2,12					I
appr-1-p	UE-BINT-SP-001-050.F.A02	-2,34	-2,07					I
c-myc binding protein / prefoldin	UE-BINT-SP-001-014.F.G06				1,64			I
DnaJ protein	UE-BINT-SP-001-061.F.D06	-2,74	-2,67					I
Eukaryotic translation initiation factor 3	UE-BINT-SP-001-061.F.G08	-1,76						I
Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase	UE-BINT-SP-001-061.F.A04	-2,09	-2,02					I
Translation initiation factor 3 (eIF-3)	UE-BINT-SP-001-049.F.F09	-2,84						I
Vacuolar processing enzyme-1a	UE-BINT-SP-001-018.F.A05	-1,94	-2,16	-1,71				I
40S ribosomal protein	UE-BINT-SP-001-006.F.A03		1,68					II
Non-cell-autonomous heat shock cognate protein 70	UE-BINT-SP-001-014.F.G05		3,82	3,57				II
PDI-like protein	UE-BINT-SP-001-012.F.F01		4,5					II
Proline-rich spliceosome-associated (PSP) protein	UE-BINT-SP-001-008.F.A09	2,35						II
Heat shock protein	UE-BINT-RT-001-050.F.H11	2,22			-2,79			II

Continuação da **Tabela 1:**

Provável Função	Seqüência	Início vs Controle	30 dai vs Controle	60 dai vs Controle	30 dai vs Início	60 dai vs Início	60 dai vs 30 dai	Perfil de expressão
Skp1	UE-BINT-RT-001-046.F.D11				-1,72			II
Proteasome inhibitor	UE-BINT-SP-001-009.F.G01		2,24					III
tRNA-Leu(UAA)	UE-BINT-RT-001-017.F.E01						-2,13	IV
Proteasome 26S	UE-BINT-RT-001-016.F.E10						-2,18	IV
Protein disulfide isomerase precursor	UE-BINT-RT-001-014.F.E04						-1,76	IV
Tetratricopeptide repeat (TPR) protein	UE-BINT-RT-001-013.F.F07						-2,61	IV
RING zinc finger protein	UE-BINT-SP-001-020.F.F08			-2,26				V
Serine carboxypeptidase S10	UE-BINT-SP-001-034.F.G08			-1,77				V
Sterile alpha motif (SAM) domain- containing protein	UE-BINT-RT-001-044.F.D08	-2,43						V
Ubiquitin conjugating enzyme E2	UE-BINT-SP-001-044.F.E03				1,7			V
60S ribosomal protein L11	UE-BINT-RT-001-001.F.G09	-2,78						V
DNAJ heat shock protein	UE-BINT-RT-001-057.F.B08						-2,17	V

Tabela 2: Lista dos 78 genes diferentemente expressos na variedade TSH 1188. A classificação funcional, a taxa de mudança, a significância estatística e o perfil de expressão no agrupamento hierárquico são mostrados.

Provável Função	Seqüência	Início vs Controle	30 dai vs Controle	60 dai vs Controle	30 dai vs Início	60 dai vs Início	60 dai vs 30 dai	Perfil de expressão
Ciclo Celular								
Kinesin	UE-BINT-RT-001-059.F.E12					-1,51		II
Defesa e resgate celular								
Resistance protein RGC2	UE-BINT-SP-001-021.F.E02				-2,10	-1,98		IV
Expressão gênica								
Zinc finger homeobox family protein	UE-BINT-RT-001-028.F.E04							
Zinc finger protein	UE-BINT-RT-001-015.F.H07							
Função desconhecida								
Thylakoid lumenal 20 kDa protein	UE-BINT-RT-001-016.F.F07					-1,58		III
Oryza sativa genomic DNA	UE-BINT-SP-001-033.F.E04				-1,84	-2,24		IV
Rattus norvegicus clone CH230-206L9	UE-BINT-RT-001-008.F.E05	2,98			-3,52	-3,33		IV
Unknown protein	UE-BINT-RT-001-025.F.C03					-3,02		IV
Expressed protein	UE-BINT-RT-001-012.F.E02					-1,58		III
Homo sapiens clone CTD-2249K22	UE-BINT-RT-001-026.F.H10	3,06			-3,32	-3,46		IV
Homo sapiens clone RP11-472A1	UE-BINT-SP-001-023.F.E04				2,13			V
Proline-rich phosphoprotein	UE-BINT-RT-001-027.F.F11					1,64		V
Estímulo abiótico								
Late embryogenesis abundant protein	UE-BINT-RT-001-001.F.C08						2,39	VI
Parede celular								
Glycoside hydrolase family 28 protein	UE-BINT-RT-001-030.F.A06	-1,81						II
Hydroxyproline-rich glycoprotein protein	UE-BINT-RT-001-015.F.G02				-3,57			IV
Metabolismo primário								
Dehydrogenase F23N20.17	UE-BINT-RT-001-030.F.C08			-2,01				I
Thioredoxin H-type 1 (TRX-H-1)	UE-BINT-SP-001-009.F.B04			-2,04				I

Continuação da **Tabela 2:**

Provável Função	Seqüência	Início vs Controle	30 dai vs Controle	60 dai vs Controle	30 dai vs Início	60 dai vs Início	60 dai vs 30 dai	Perfil de expressão
NADH dehydrogenase	UE-BINT-RT-001-059.F.A12	1,75						III
Cytochrome oxidase subunit II	UE-BINT-RT-001-005.F.E08				-4,80	-4,85		IV
Metabolismo secundário								
Polyphenol oxidase	UE-BINT-RT-001-014.F.H05		1,96				-2,05	V
Transporte de membranas								
Purine permease	UE-BINT-RT-001-001.F.H05					2,37		VI
Tonoplast intrinsic protein	UE-BINT-SP-001-033.F.F12					-1,79		IV
Miscelâneas								
Lipoxygenase	UE-BINT-RT-001-001.F.E07			1,75				VI
Transdução de sinal								
Calcineurin B-like protein 10 (CBL10)	UE-BINT-RT-001-035.F.E09					-2,39		IV
Sem Homologia								
No-Hit	UE-BINT-RT-001-017.F.E12			-1,57				I
No-Hit	UE-BINT-RT-001-005.F.B09			-1,66				I
No-Hit	UE-BINT-SP-001-044.F.D04			-1,89				I
No-Hit	UE-BINT-RT-001-007.F.E02		-2,49	-2,13				I
No-Hit	UE-BINT-RT-001-016.F.E08			-1,98				II
No-Hit	UE-BINT-RT-001-006.F.G03					-1,66		III
No-Hit	UE-BINT-RT-001-058.F.F12	2,14				-1,5		IV
No-Hit	UE-BINT-RT-001-002.F.D05	4,34			-4,16	-3,96		IV
No-Hit	UE-BINT-RT-001-028.F.C02				-3,07	-3,21		IV
No-Hit	UE-BINT-SP-001-007.F.E09				-1,5	-1,74		IV
No-Hit	UE-BINT-RT-001-026.F.H07	-2,79			2,67			V
No-Hit	UE-BINT-RT-001-026.F.H02					2,59		V
No-Hit	UE-BINT-RT-001-049.F.E09	-1,81						V
No-Hit	UE-BINT-RT-001-001.F.F02				1,71			V
No-Hit	UE-BINT-RT-001-025.F.E04						1,71	V

Continuação da **Tabela 2:**

Provável Função	Seqüência	Início vs Controle	30 dai vs Controle	60 dai vs Controle	30 dai vs Início	60 dai vs Início	60 dai vs 30 dai	Perfil de expressão
No-Hit	UE-BINT-RT-001-027.F.A01		1,98					VI
No-Hit	UE-BINT-RT-001-001.F.E06			2,17				VI
No-Hit	UE-BINT-RT-001-046.F.A02					1,86	1,6	VI
Síntese e processamento de proteínas								
18S	UE-BINT-SP-001-007.F.G07			-1,81				I
60S RIBOSOMAL PROTEIN L36	UE-BINT-SP-001-033.F.H09			-2,15				I
Copper-binding protein (CUTA)	UE-BINT-SP-001-047.F.C02			-2,45				I
F-box protein	UE-BINT-SP-001-010.F.A04	-2,41						I
Proline-rich spliceosome-associated (PSP) family protein	UE-BINT-SP-001-008.F.A09						-2,07	I
Protease inhibitor/seed storage/Lipid transfer protein (LTP)	UE-BINT-SP-001-002.F.G05			-2,13				I
Protease inhibitor 2	UE-BINT-SP-001-012.F.B04	-3,65	-3,17	-3,38				I
RING-H2 finger protein	UE-BINT-SP-001-036.F.B12			-1,51				I
Translation elongation factor eEF-1	UE-BINT-SP-001-002.F.E11			-2,16				I
Translation initiation factor B04	UE-BINT-SP-001-011.F.A11			-2,67				I
Translation initiation factor IF-3-like	UE-BINT-SP-001-036.F.A05						-2,02	I
Translational activator family protein	UE-BINT-SP-001-005.F.H06	-3,7						I
Ubiquitin conjugating enzyme E2	UE-BINT-SP-001-044.F.E03			-1,87				I
Ubiquitin family protein	UE-BINT-SP-001-033.F.H05			-2,81				I
20S proteasome alpha subunit F	UE-BINT-SP-001-006.F.A04			-1,54				II
Blue copper-binding protein	UE-BINT-SP-001-034.F.F08			-1,51				II
Cyclophilin	UE-BINT-RT-001-004.F.C05			-1,59				II
Dicyanin	UE-BINT-SP-001-051.F.C07			-2,15				II
DNAJ heat shock N-terminal domain protein	UE-BINT-SP-001-034.F.A04			-2,21				II
DNAJ heat shock N-terminal domain protein	UE-BINT-SP-001-002.F.A01		-1,62					II
Elongation factor 1-gamma	UE-BINT-SP-001-006.F.D01			-2,31				II
Glutamyl-Trna synthetase	UE-BINT-SP-001-036.F.F06					-1,53		II
Proteasome inhibitor	UE-BINT-SP-001-009.F.G01		-1,69					II
Proteasome subunit beta type 3-1	UE-BINT-SP-001-001.F.E07			-1,56				II

Continuação da **Tabela 2:**

Provável Função	Seqüência	Início vs Controle	30 dai vs Controle	60 dai vs Controle	30 dai vs Início	60 dai vs Início	60 dai vs 30 dai	Perfil de expressão
S18.A ribosomal protein	UE-BINT-SP-001-020.F.A07					-2,01	-2,53	II
21 kDa seed protein	UE-BINT-RT-001-002.F.E01	2,0			-3,16			III
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	UE-BINT-RT-001-002.F.G04	2,4				-4,38		III
Seryl-tRNA synthetase / serine-tRNA ligase	UE-BINT-SP-001-036.F.A03					-1,86		III
trnT-trnL	UE-BINT-SP-001-019.F.B11					-1,59		III
trnT-trnL intergenic spacer	UE-BINT-RT-001-017.F.F10			-2,22				III
Ubiquitin / ribosomal protein CEP52	UE-BINT-SP-001-017.F.B05					-1,84		III
60S ribosomal protein L41	UE-BINT-SP-001-024.F.A04				-1,78			IV
F-box family protein	UE-BINT-RT-001-016.F.G10					2,45		V
60S ribosomal protein L11	UE-BINT-RT-001-001.F.G09			1,52		2,11		VI

Tabela 3: Lista dos 62 genes diferentemente expressos entre as variedades TSH 1188 e Catongo (TSH 1188/Catongo) nas fases Início, 30 dai e 60 dai.

Provável Função	Seqüência	TSH 1188 vs Catongo	Valor P
Início			
Cytochrome oxidase subunit II	UE-BINT-RT-001-005.F.E08	5,03	2,8E-36
26S	UE-BINT-SP-001-004.F.D11	3,78	0,005
Rattus norvegicus clone CH230-206L9	UE-BINT-RT-001-008.F.E05	3,65	5,8E-36
No-Hit	UE-BINT-RT-001-002.F.D05	3,62	0,006
hydroxyproline-rich glycoprotein	UE-BINT-RT-001-015.F.G02	3,49	0,01
Expressed protein	UE-BINT-RT-001-012.F.E02	3,44	7,2E-36
No-Hit	UE-BINT-RT-001-028.F.C02	3,19	9,1E-36
Unknown protein	UE-BINT-RT-001-025.F.C03	3,01	1,5E-35
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	UE-BINT-RT-001-002.F.G04	2,64	0,06
Resistance protein RGC2	UE-BINT-SP-001-021.F.E02	2,49	6,1E-36
NADH dehydrogenase	UE-BINT-RT-001-059.F.A12	2,46	0,02
Calcineurin B-like protein 10 (CBL10)	UE-BINT-RT-001-035.F.E09	2,38	0,06
Expressed protein	UE-BINT-RT-001-015.F.H09	2,32	2,5E-35
Oryza sativa genomic DNA	UE-BINT-SP-001-033.F.E04	2,23	7,4E-36
No-Hit	UE-BINT-RT-001-058.F.F12	2,08	0,03
c-myc binding protein / prefoldin	UE-BINT-SP-001-014.F.G06	1,89	0,04
Tonoplast intrinsic protein	UE-BINT-SP-001-033.F.F12	1,78	E-35
DnaJ	UE-BINT-SP-001-049.F.F02	1,76	0,05
No-Hit	UE-BINT-SP-001-007.F.E09	1,73	1,1E-35
Dihydroxy-acid dehydratase	UE-BINT-SP-001-036.F.D04	1,7	1,1E-35
Prefoldin-related KE2 family protein	UE-BINT-SP-001-005.F.H02	1,66	0,04
OSJNBa0006A01.2	UE-BINT-SP-001-025.F.C02	1,62	0,05
Unknown	UE-BINT-SP-001-022.F.A07	1,6	1,3E-35
Peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)	UE-BINT-RT-001-002.F.H02	1,6	0,008
Photosystem I reaction center subunit VI	UE-BINT-SP-001-036.F.H06	1,5	3,8E-35
Latex cyanogenic beta glucosidase	UE-BINT-RT-001-001.F.C01	-1,68	0,1
Expressed protein	UE-BINT-RT-001-004.F.C06	-1,79	0,1
No-Hit	UE-BINT-RT-001-001.F.F02	-1,79	0,1
30 dai			
Hypothetical protein	UE-BINT-RT-001-044.F.H05	2,02	0,06
Calmodulin-binding family protein	UE-BINT-RT-001-042.F.D10	1,52	0,04
60S ribosomal protein L31	UE-BINT-RT-001-004.F.B09	-1,53	0,03
Carboxyl transferase alpha subunit	UE-BINT-RT-001-012.F.G05	-1,54	0,08
Glycine-rich RNA binding protein	UE-BINT-SP-001-036.F.H10	-1,65	0,07
Late embryogenesis abundant protein	UE-BINT-RT-001-001.F.C08	-1,77	0,03
Hydroxyproline-rich glycoprotein	UE-BINT-RT-001-015.F.G02	-1,78	0,08
Hypothetical protein	UE-BINT-RT-001-010.F.G02	-2,42	0,09
Phosphoglucomutase	UE-BINT-RT-001-058.F.F10	-2,46	0,03
Apocytochrome f precursor	UE-BINT-RT-001-007.F.E06	-2,86	0,06
Profilin 1	UE-BINT-RT-001-004.F.A12	-3,02	0,07
Cyclophilin	UE-BINT-RT-001-004.F.C05	-3,33	0,01
60 dai			
No-Hit	UE-BINT-RT-001-049.F.E09	3,17	0,02
Glycosyl hydrolase family 38 protein	UE-BINT-RT-001-025.F.E03	2,68	0,05
No-Hit	UE-BINT-RT-001-046.F.A02	2,68	0,009
tRNA-Leu(UAA)	UE-BINT-RT-001-017.F.E01	2,63	0,06
Eukaryotic translation initiation factor 3	UE-BINT-SP-001-061.F.G08	2,18	0,04
Proteasome 26S	UE-BINT-RT-001-016.F.E10	2,16	0,05
No-Hit	UE-BINT-RT-001-001.F.E06	2,02	0,01
F-box family protein	UE-BINT-RT-001-016.F.G10	1,93	0,1

Continuação da **Tabela 3**:

Genes	Seqüência	TSH 1188 vs Catongo	Valor P
ORF77	UE-BINT-RT-001-046.F.A04	1,9	0,09
Protein disulfide isomerase precursor	UE-BINT-RT-001-014.F.E04	1,82	0,02
Unnamed protein	UE-BINT-RT-001-046.F.F05	1,75	0,04
Sterile alpha motif (SAM) domain protein	UE-BINT-RT-001-044.F.D08	1,64	0,1
60S ribosomal protein L10A	UE-BINT-SP-001-019.F.F02	1,63	0,1
No-Hit	UE-BINT-RT-001-046.F.F11	1,62	0,09
PDI-like protein	UE-BINT-SP-001-012.F.F01	-1,63	0,02
No-Hit	UE-BINT-RT-001-026.F.F09	-1,73	4,5E-35
No-Hit	UE-BINT-RT-001-047.F.H11	-1,91	0,02
S18.A ribosomal protein	UE-BINT-SP-001-020.F.A07	-2,08	0,08
No-Hit	UE-BINT-RT-001-042.F.H03	-2,51	0,06
Acidic nuclear phosphoprotein	UE-BINT-RT-001-017.F.D01	-2,66	0,04
At1g61040/T7P117	UE-BINT-RT-001-006.F.G02	-2,88	0,1
MRG family protein	UE-BINT-RT-001-009.F.F02	-3,3	0,007

5. DISCUSSÃO

5.1. Obtenção dos primeiros arranjos do cacauero em resposta a infecção por *Moniliophthora perniciosa*

Doenças causadas por fungos e oomicetos constituem um dos maiores desafios para milhares de produtores de cacau nas regiões tropicais onde se encontra *T. cacao*. Entender os mecanismos pelos quais o cacau responde à infecção pelos patógenos pode levar ao desenvolvimento de marcadores moleculares a partir de genes de defesa chaves que poderão ser utilizados para acelerar os programas de melhoramento (KAZAN et al., 2001). Para esse fim, estudos de expressão gênica em larga escala são de fundamental importância na identificação dos grupos gênicos relevantes nas interações compatível e incompatível.

Diante desse contexto foram desenvolvidos os primeiros estudos de expressão gênica das interações suscetível e resistente *T. cacao-M. perniciosa*. A metodologia aplicada foi análise de expressão diferenciada baseada em hibridação em membrana de náilon. Esse sistema de estudo de expressão diferenciada baseado em hibridação é múltiplo e varia em relação ao suporte do arranjo (slides de vidro vs membranas) e da marcação do *pool* de cDNA alvo utilizado (radioativa, fluorescente ou quimiluminescente). Um sistema muito utilizado é a imobilização dos produtos de PCR em slides de vidro e hibridação com mRNA marcado com fluorescência de duas cores (SCHENA et al., 1995). Outro protocolo utiliza imobilização de um grande número de curtos oligonucleotídeos em slides de vidro hibridados com mRNA marcado com fluorescência (LOCKHART et al., 1996). Membranas de filtros de náilon combinados com cDNA marcado com radioatividade tem sido aplicado (NGUYEN et al., 1995), bem como combinado com detecção colorimétrica (SKIBA et al., 2005).

O sistema utilizado nesse estudo consistiu na imobilização de produtos de PCR em membranas de náilon, na marcação do cDNA alvo através da sua ligação direta com a enzima

fosfatase alcalina e na detecção do sinal de quimiluminescência pela degradação do substrato (dioxetano) pela enzima, utilizando aparatos de autoradiografia padrão. Devido à curta meia vida dos isótopos radioativos geralmente utilizados em experimentos de arranjos ($^{33}\text{P}/25$ dias, $^{32}\text{P}/14,3$ dias) e as drásticas condições de segurança laboratorial necessárias para trabalhar com radioatividade (incluindo infra-estrutura adequada), a utilização de marcação não-radioativa pode ser considerada como um avanço significativo tendo como vantagens a segurança no desenvolvimento dos experimentos, a sua possível utilização em qualquer laboratório sem necessidade de infra-estrutura adequada, além de apresentar uma alta sensibilidade (CHEN et al., 2003). Esse sistema tem sido empregado em estudos de macroarranjos em expressão diferenciada durante o desenvolvimento do fungo fitopatogênico *Heterobasidion parviporum* (LI et al., 2006) e em estudos de interação planta-patógenos envolvendo *Pinus sylvestris* e os fungos *Gremmeniella abietina* e *Heterobasidion annosum* (ADOMAS e ASIEGBU, 2006), comprovando a sua eficiência e confiabilidade para esses tipos de aplicações.

Os dados de experimentos de expressão diferenciada baseada em hibridação em membrana de náilon são altamente sujeitos a variações sistemáticas ou aleatórias referentes a fatores experimentais que afetam a mensuração de variações biológicas (DAWES e GLASSEY, 2007). As principais fontes de variação sistemática desses dados são a diferença de marcação de uma membrana para outra, a diferença na quantidade de RNA inicial utilizado para marcação e hibridação, e a diferença de ajustes dos parâmetros do *scanner* (BALDI e HATFIELD, 2002), além de problemas relacionados com a reação de amplificação do RNA quando esse protocolo é utilizado (WANG, 2005). Nos experimentos descritos nessa dissertação alguns parâmetros foram controlados, incluindo a quantidade do cDNA alvo utilizado para marcação (100 ng/ μl), os ajustes do ImageScanner (Amershan) para captura das imagens e do software BZScan para a quantificação das imagens.

Antes das análises dos dados, foi realizada uma análise exploratória usando ferramentas gráficas, como os gráficos MA e os gráficos em caixa (*box plot*) para avaliar a distribuição dos valores de M entre os diferentes experimentos, de modo a visualizar os vieses sistêmicos. Nessa avaliação, toda fonte de variabilidade sistemática deve ser identificada e removida através do processo de normalização. Em geral, os métodos de normalização assumem que a maioria dos *spots* não deve apresentar diferenças de expressão entre os tipos biológicos estudados, isto é, a média dos valores de M para uma membrana de macroarranjo deve ser zero (BALDI e HATFIELD, 2002). A normalização é estabelecida com a estimação do termo que modela o viés de posição dos dados (fator c) de uma forma linear (independente

da intensidade) ou não linear (dependente da intensidade) (ESTEVES, 2007). Os modelos dependentes da intensidade, como a regressão robusta localmente ponderada (*lowess*), envolvem abordagens de maior complexidade matemática (WU et al., 2005; DAWES e GLASSEY, 2007). A normalização global é a maneira mais simples de se estimar o valor c , assumindo que as marcações das amostras biológicas apresentam valores de intensidade proporcional e constantes para todos os *spots* da membrana (YANG et al., 2002). Os dados são centralizados ao redor de zero (ver Figuras 9 e 10), sendo que o valor c é a média aritmética dos valores de M que passaram pelos filtros de qualidades onde foram excluídos os genes controle (e.g. genes de *Xanthomonas*), vazios (sem *spot* na membrana) ou com baixa qualidade (baseada no valor de QM).

Após a normalização e a identificação dos genes diferentemente expressos foi determinada a significância estatística dos resultados. Os experimentos de hibridação são tipicamente variáveis e a detecção de expressão diferenciada com repetições, junto com significância estatística, é uma maneira acurada e sensível de identificar genes diferentemente expressos em arranjos de náilon (HERWIG et al., 2001). O teste comumente mais usado nas análises dos dados de arranjos é a estatística t de *Student*, a qual assume que a série de dados são normalmente distribuídos e com a mesma variância (HERWIG et al., 2001). Segundo Wille et al. (2007), em experimentos de arranjos de cDNA as variâncias são distintas e dependem, ao menos em parte, da função do conjuntos de sondas nos experimentos de arranjos de cDNA, sendo que os genes para proteínas ribossomais ou estruturais geralmente apresentam pouca variância, enquanto genes implicados em respostas de estresses freqüentemente tem grandes variâncias. Portanto, o teste estatístico utilizado neste trabalho foi a estatística F (análise de variância), para eliminar através da estimativa da variância entre os dados de três repetições para cada ponto estudado (e.g. Início vs controle) os genes cuja diferença de expressão não é significativa.

Em Catongo, foram identificados 282 genes diferentemente expressos a partir do limiar estabelecido (menores que -1,5 ou maiores que 1,5), sendo 112 considerados significativos após a análise estatística (Tabela 1), o que corresponde a 39,71% do total de genes que apresentaram mudanças na taxa de expressão. Para TSH 1188, dos 207 genes diferentemente expressos, 78 foram significativos (37,66%). Esses valores percentuais indicam a importância da utilização de testes estatísticos, como o teste F , na determinação dos genes significativos, com uma taxa de eliminação de genes não confiáveis de aproximadamente 60%.

Os 112 e 78 genes diferentemente expressos e significativos encontrados em Catongo e TSH 1188, respectivamente, correspondem a 3,92% e 2,73% do total de 2855 sondas EST imobilizadas na membrana de náilon. Estas proporções são menores das encontradas nos experimentos de macroarranjos por Eichmann et al. (2006) com 6,11% e Mozoruk et al. (2006) com 8,66%. Esta diferença de proporção pode ser relacionada ao fato que Eichmann et al. (2006) e Mozoruk et al. (2006) utilizaram como conjunto de sondas somente alguns genes já conhecidos serem responsivos ao ataque de patógeno e a indutores químicos, enquanto no experimento de arranjos da interação *T. cacao-M. pernicioso* foi utilizado todo o conjunto *unigene* das bibliotecas *full length* desenvolvidas por Gesteira et al. (2007).

A análise de agrupamento hierárquico foi empregada nos dados para se ter uma visão do comportamento de cada gene em relação aos outros durante o curso das interações compatíveis e incompatíveis, sendo mais uma ferramenta na análise exploratória dos dados. A análise utilizada foi a supervisionada por vetores de referências, indicado por valores estatisticamente significantes dos genes encontrados nos pontos estudados da interação. As Figuras 16 e 18 mostram o perfil temporal dos seis maiores grupos das variedades Catongo e TSH 1188, respectivamente. A utilização de genes que são significativamente induzidos ou reprimidos nas análises funcionais permite uma análise mais robusta e evita que os genes estejam localizados em grupos errados gerando informações biológicas inconsistentes (EISEN et al. 1998).

5.2. Genes diferentemente expressos entre as fases Início, 30 dai, 60 dai das interações compatíveis e incompatíveis *T. cacao-M. pernicioso* e entre genótipos

Durante o curso das interações compatíveis e incompatíveis foram analisados os tempos Início, 30 e 60 dai. O tempo Início corresponde ao *pool* dos transcritos presentes em 24, 48 e 72 h após a inoculação. A junção desses pontos para formar o *pool* apareceu como pertinente em relação às observações histológicas da interação *T. cacao-M. pernicioso*. Em estudos histológicos da interação suscetível e resistente de cacau-*Moniliophthora pernicioso* realizados por Sreenivasan e Dabydeen (1989) e Silva e Matsuoka (1999), foi verificou-se que a partir de 6 horas após a inoculação ocorre a germinação dos basidiósporos e 12 horas após a inoculação, os basidiósporos emitem tubos germinativos bem desenvolvidos, mas sem a formação de apressório, entrando no tecido vegetal por penetração direta ou através dos estômatos (KILARU e HASENSTEIN, 2005). Segundo Silva e Matsuoka (1999), não são observadas ao microscópico hifas do patógeno nos tecidos durante os intervalos iniciais (6,

12, 24, 48, 72 h) da interação resistente e suscetível, porém após essa fase inicial da interação (fase assintomática) houve diferenças de desenvolvimento do patógeno entre progênie, sendo que o suscetível apresentava-se com maior área colonizada e com maior concentração de hifas no tecido do que no resistente. Assim, foi considerado que o tempo Início corresponde a fase inicial da interação (fase assintomática onde acontece essencialmente a adesão e penetração do fungo) enquanto, após 72 h, observa-se o início da colonização da planta pelo fungo.

Nos experimentos foi verificada uma alteração do perfil de expressão gênica durante o tempo Início, com genes sendo reprimidos e outros sendo induzidos, mas com particularidades para cada variedade, o que pode ser correlacionado com as observações histológicas. O grupo I de Catongo e os grupos I e II de TSH 1188 apresentaram os genes que sofreram repressão em sua expressão a partir do Início da interação. Esses grupos são formados principalmente por genes envolvidos na síntese e processamento de proteínas. Essa constatação também foi verificada nas Figuras 13B e 14B que evidencia que essa classe corresponde à maioria dos genes reprimidos.

Os genes induzidos com a presença do patógeno no Início são observados no grupo II em Catongo e nos grupos III e IV em TSH 1188. Em Catongo, é encontrado no grupo II um gene codificante para proteína de choque térmico e um para cisteína protease tipo OTU. As proteínas de choque térmico são chaperonas moleculares que são requeridas para manter e restaurar a homeostase durante a condição de estresse (BANIWAL et al., 2004), o que indica a presença do fungo e o início do estresse biótico. As cisteína proteases são membros da maquinaria proteolítica envolvida em resposta de defesa das plantas ao ataque de patógenos (VAN DER HOORN e JONES, 2004). Nesse período também ocorreu à indução de proteínas PRs (endoquitinase), que são proteínas relacionadas à defesa que limitam o desenvolvimento do patógeno no tecido vegetal (VAN LOON et al., 2006) e proteínas relacionadas ao reforço de parede celular (precursor da proteína rica em prolina) (SHOWALTER, 1993).

Outro gene relacionado à defesa que foi encontrado em Catongo no grupo II foi uma fosfatase tipo 2C. Proteínas quinase induzidas por estresse têm uma atividade transiente quando recebem um estímulo. O regulador negativo dessa rota são proteínas fosfatases e em plantas o regulador negativo de MAP kinase induzida por estresse são as fosfatases 2C (MESKIENE et al., 2003). Plantas de *Arabidopsis*, cuja fosfatase 2C foi mutada, produzem altas quantidades de jasmonato em resposta a ferimentos e são mais resistentes ao ácaro fitófago (*Tetranychus urticae*), enquanto que plantas superexpressando esse gene mostram diminuição na ativação de MAPKs relacionadas com ferimento e comprometimento da resistência contra o patógeno necrotrófico *Botrytis cinerea* (SCHWEIGHOFER et al., 2007).

Diferente do que foi encontrado em Catongo, em TSH 1188 foram identificados alguns genes importantes induzidos no Início, entre eles genes codificantes para proteína de resistência do grupo 2, calcineurina B e a glicoproteína rica em hidroxiprolina. O gene candidato de resistência do grupo 2 foi induzido no Início e pode estar envolvido na sinalização das respostas de defesa. Na literatura, foi mostrado que os genes candidatos de resistência 2 (RGC2) compreendem uma família de genes duplicados com domínio de ligação a nucleotídeos e regiões com repetições ricas em leucina (tipo NBS-LRR) (MCHALE et al., 2006). Em alface (*Lactuca sativa*), estes genes estão organizados em um locus complexo com membros transcricionalmente ativos e pseudo-genes (KUANG et al., 2004). Em alface os membros dessa família correspondem aos genes de efeito principal que confere resistência quantitativa ao mídio causado pelo oomiceto *Bremia lactucae* (MEYERS et al., 1998). Os genes de resistência codificam proteínas que compõem o sistema de vigilância nas interações planta-patógeno. Estas proteínas estão envolvidas no reconhecimento e a ativação das respostas de defesa (MARTIN et al., 2003; CHISHOLM, et al., 2006). Assim a indução do gene de resistência 2 em TSH 1188 após a infecção do fungo *M. perniciosa* pode ser comparada a indução do gene de resistência Xa21 do arroz que foi induzido apenas na variedade resistente e somente após a inoculação do patógeno *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (GU et al., 2005), caracterizando genes R com expressão diferenciada nas interações incompatíveis.

Estresses bióticos provocam mudanças na concentração de Ca^{2+} nas plantas o que desencadeia a ativação de uma complexa rede de sinalização de rotas interconectadas (LUAN et al., 2002). As calcineurinas B, assim como as calmodulinas, são pequenas proteínas que contêm múltiplos domínios de ligação ao Ca^{2+} e que regulam a atividade das proteínas kinase (SHI et al., 1999). Os genes para proteínas calcineurina B em *Arabidopsis* são diferentemente regulados por estresses, e estão envolvidos na sinalização mediada por cálcio durante a resposta a estresse biótico (KUDLA et al 1999). Por essas razões, a indução da expressão do gene calcineurina B em TSH 1188 constitui um evento a ser possivelmente considerado para um melhor entendimento das vias de sinalização da resistência.

As glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, assim como as proteínas ricas em prolina, são proteoglicanos e componentes estruturais da parede celular das plantas. Elas também se acumulam na parede celular em resposta a infecção por patógeno, como um aparente mecanismo de defesa (SHOWALTER et al., 1985). Em milheto (*Pennisetum glaucum* L.), a deposição e as ligações cruzadas de glicoproteína rica em hidroxiprolina na parede celular contribuem para a resistência ao oomiceto fitopatogênico *Sclerospora graminicola* (DEEPAK

et al., 2007). Apesar de não haver comprovações histo-citológicas que comprovem a modificação da composição da parede celular em TSH 1188, pode ser hipotetizado que esta glicoproteína rica em hidroxiprolina participa da formação de uma barreira física no cacau em resposta a ataque de *M. pernicioso* na fase inicial da interação incompatível.

Com o progresso da interação, foi investigada a expressão diferenciada dos genótipos resistente e suscetível aos 30 dai. Nesse período, na interação compatível, foi observado um grande desenvolvimento de hifas intercelulares e os sintomas de vassoura verde com o surgimento de necroses parciais nos tecidos (SCARPARI et al., 2005) sendo que nenhum sintoma foi observado na variedade resistente TSH 1188 (CEITA et al., 2007). Entre os genes induzidos em Catongo nesse período, a expressão do gene da glicoproteína rica em hidroxiprolina (grupo III) evidencia uma distinta cinética em comparação a TSH 1188, quando estava diferencialmente expresso logo na fase início. A expressão desse gene durante esse período é correlacionada com os trabalhos histológicos que evidenciaram que no contato da hifa intercelular com a célula de Catongo ocasionou em modificações na parede celular, que se apresentava espessada (SILVA e MATSUOKA, 1999).

Outros genes envolvidos na resposta a estresse foram encontrados nesse período como a proteína relacionada a patogênese 4 (PR4 / quitinase), proteína dissulfeto isomerase, proteossomo 26S, enzima de conjugação a ubiquitina E2, serina carboxipeptidase S10, proteína de choque térmico DNAJ e PCD4. O gene da quitinase expresso em 30 dai em Catongo pode estar ligado à presença de uma massa micelial do patógeno maior no genótipo suscetível nesse período, e correlacionado à indução da protease serina carboxipeptidase S10, proteínas de choque térmico (proteína de choque térmico DNAJ) e ativação de rotas de degradação de proteínas via ubiquitina-proteossomo 26S. A proteína dissulfeto isomerase (grupo IV), um tipo de chaperona molecular, foi encontrada no processo de defesa do trigo ao fungo hemibiotrófico *Mycosphaerella graminicola* (RAY et al., 2003).

A proteína de PCD4 (supressor de apoptose) apresenta sua expressão levemente induzida em 30 dai e reprimida em 60 dai, o que fortalece a hipótese da existência de um processo de PCD na interação suscetível cacau-*M. pernicioso*, inicialmente ocorrendo na planta como mecanismo de defesa e em seguida contribuindo para a dicarionização do micélio e a complementação do ciclo fúngico (CEITA et al., 2007).

Comparando os dois genótipos aos diferentes pontos estudados da interação, foram observadas diferenças na quantidade de transcritos induzidos. Como observado na Tabela 3, foram encontrados mais transcritos no Início e em 60 dai no TSH 1188, e em 30 dai em Catongo. No caso do TSH 1188, esta constatação pode estar relacionada as reações de defesa

para resistência no Início, e para atividade metabólica não evidentemente relacionada à presença de patógeno em 60 dai, em comparação ao estado visível de senescência ocorrendo em Catongo a 60 dai. Em 30 dai no Catongo, a planta infectada está envolvida no processo de PCD (CEITA et al., 2007) o que explica a maior abundância na quantidade de transcritos nesse período.

5.3. Comparação com resultados de outros estudos de expressão de genes em cacau disponível na literatura

Alguns genes foram comuns entre os identificados nos estudos de expressão gênica do presente trabalho durante a progressão da interação compatível e incompatível, e os induzidos em cacau após aplicação de indutores de defesa por duas horas (VERICA et al., 2004). Em Catongo foram identificados genes codificando: i) proteínas de ligação à clorofila a/b induzidas por BTH; ii) proteína DNAJ e histonas induzidas por MJE; iii) subunidade VI do centro de reação do fotosistema I e enzima de processamento vacuolar (VPE) induzidos por Nep1; iv) proteína de choque térmico induzida por BTH e MJE; v) proteína ribossomal 40S induzida por BTH e Nep1; vi) fosfatase 2C induzidas por MJE e Nep1; e vii) proteína ribossomal 60S e proteína de estocagem de sementes de 21 kDa induzidas pelos três indutores BTH, MJE e Nep1. Em TSH 1188, os genes em comum foram: i) proteínas de ligação para a clorofila a/b e proteína da família F-box (BTH); ii) thioredoxina (MJE); iii) proteína DnaJ (MJE); iv) proteína de ligação ao cobre (Nep1); v) NADH desidrogenase (BTH/Nep1); vi) ubiquitina (MJE/Nep1); e vii) proteína de estocagem de sementes de 21 kDa (BTH/MJE/Nep1).

Os indutores ácido salicílico e etileno estão envolvidos na interação suscetível. Chaves e Gianfagna (2006) mostraram que o fungo *M. pernicioso* causa acúmulo de ácido salicílico por produzir essa molécula nos tecidos de cacau infectados, o que causa alteração na maquinaria de defesa da planta, possivelmente relacionada com ácido jasmônico. O etileno se acumula nos ramos infectados de cacau entre 21 e 61 dai (SCARPARI et al., 2005). Devido ao fato de Verica et al. (2004) ter realizado os experimentos de estimulação com metil jasmonato e etileno juntos, possivelmente o etileno é o maior responsável pela ativação na interação suscetível e o jasmonato na interação incompatível.

A comparação entre os dois trabalhos é evidente, como por exemplo, o gene da subunidade VI do centro de reação do fotosistema I que é induzido por Nep1 e é encontrado no grupo III de Catongo que representa os genes que são induzidos em 30 dai, período

equivalente da detecção de Nep1 produzida pelo *M. pernicioso* nos tecidos infectados de cacau (GARCIA et al., 2007). Os genes para DNAJ e histonas H3 e H4 são induzidos também por MJE e pertencem aos grupos IV e V de Catongo, que são induzidos aos 30 dai, período equivalente ao aumento de etileno nos ramos infectados (SCARPARI et al. 2005).

Esses genes demonstram a existência da participação desses indutores de defesa sintetizados pelas plantas (SA, JA, ET) e das proteínas secretadas pelo fungo (Nep), como fatores de patogenicidade na alteração da expressão gênica durante a interação, e que existem rotas de regulação interconectadas, envolvendo esses indutores em cacau, como já constatado em outros patossistemas (SCHENK et al., 2000; KATAGIRI 2004).

5.4. Perspectivas

Os estudos de expressão gênica das interações planta-patógeno permitem: i) a identificação de genes chaves para o entendimento dessas interações (tanto em nível dos mecanismos de resistência quanto em nível do processo de suscetibilidade e desenvolvimento dos sintomas); ii) a implementação de estudos funcionais; e iii) a seleção de genótipos baseada em genes como ferramenta auxiliando o melhoramento genético (seleção assistida por marcadores) (KAZAN, 2001).

Os genes diferentemente expressos identificados no presente trabalho servirão como ponto de partida para estudos funcionais envolvendo o patossistema cacau-*M. pernicioso*. Primeiramente, os genes diferentemente expressos detectados no presente trabalho terão a sua expressão confirmada por PCR em tempo real nos tempos os mais pertinentes ao decorrer da doença (e.g. antes de 15 dai para o TSH 1188) e também em outras condições relevantes para o estudo das vias de sinalização relacionadas a estresses bióticos e abióticos (e.g. em plantas tratadas com indutores de defesa como ácido salicílico, jasmonato ou etileno). Em seguida, os genes com perfis de expressão diferenciada e função de interesse serão estudados mais precisamente em relação aos seus papéis na interação ou em relação ao seu potencial antifúngico (e.g. PR10 de *T. cacao*; MELO et al., 2008). Como exemplo de estudo parecido seguindo a mesmo raciocínio, podemos citar a análise de expressão de genes de quitinase em *T. cacao* realizada por Maximova et al. (2006) no estudo de resistência contra o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. Essas análises poderão também ser desenvolvidas para os genes diferentemente expressos com função desconhecida e sem homologia (Tabelas 1 e 2) e identificados em Catongo e TSH 1188. Tais genes, apesar de não apresentar função conhecida e/ou similaridade com genes conhecidos podem ser genes altamente relacionados com a

resistência e ou a doença e ser bons candidatos para futuras análises. Análise funcional desses genes, apesar de mais complicada devido à ausência de informação *a priori*, pode trazer dados inéditos na compreensão das interações compatível e incompatível.

Os genes diferentemente expressos poderão também servir de fonte para busca de polimorfismo (e.g. SSRs; LIMA et al., 2008) e futuros experimentos de mapeamento genético e seleção assistida por marcadores. A mais importante medida de controle para as doenças que afetam a produção de cacau tem sido a utilização de genótipos resistentes (DIAS, 2001). O primeiro mapa genético de alta densidade foi desenvolvido por Risterucci et al. (2000) e diferentes QTLs relacionados a resistência a VB foram também identificados (QUEIROZ et al., 2003; FALEIRO et al., 2006; SCHNELL et al., 2007). As seqüências diferenciais e polimórficas de Catongo e TSH 1188 são excelentes candidatos para mapeamento e possível co-localização com QTLs associados à resistência à doença vassoura-de-bruxa no cacauero.

Em conclusão, a análise de expressão de genes em grande escala pode ser considerada como um pré-requisito ambos para estudos funcionais e seleção assistida por marcadores, e proporcionar importantes resultados para um melhor entendimento da interação cacau-*M. pernicioso* bem como para a obtenção de soluções práticas e direcionadas ao produtor.

6. CONCLUSÕES

- Existe uma diferença qualitativa e quantitativa na expressão gênica entre as duas variedades de cacau, quando inoculados com *M. perniciosa*.
- A análise da expressão gênica em cacau, em resposta à indução a infecção causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, apontou 112 genes identificados na variedade suscetível (Catongo), enquanto 78 foram identificados na variedade resistente (TSH 1188).
- A técnica de macroarranjos com marcação quimiluminescência é uma alternativa robusta, segura e pouco dispendiosa para análise da expressão gênica em larga escala.
- Os dados mostram que o perfil da resistência pode estar relacionado principalmente com as respostas na fase assintomática da interação, período esse evidenciado pelo *pool* Início em TSH 1188 e que os genes envolvidos em suscetibilidade podem estar evidentes no *pool* Início e a 30 dai em Catongo, com o desenvolvimento de PCD em nível celular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOMAS, A.; ASIEGBU, F.O. Analysis of organ-specific responses of *Pinus sylvestris* to shoot (*Gremmeniella abietina*) and root (*Heterobasidion annosum*) pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 69, p. 140–152. 2006.

ALIGNAN, M. et al. A cDNA microarray approach to decipher sunflower (*Helianthus annuus*) responses to the necrotrophic fungus *Phoma macdonaldii*. **New Phytologist**, n. 170, p. 523-536, 2006.

ANDEBRHAN, T. et al. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brasil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p. 167-175, 1999.

ANEJA, M.; GIANFAGNA, T. J.; HEBBAR, P. K. *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 67, p. 304-307, 2005.

BACHEM, C. W et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. **Plant Journal**, v. 9, p. 745-753, 1996.

BALDI, P.; HATFIELD, G.W. **DNA Microarrays and Gene Expression: From Experiments to Data Analysis and Modeling**. 1. ed. Cambridge: UK Cambridge University Press, 2002. 213p.

BALDWIN, D.; CRANETAND, V.; RICET, D. A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 96-103, 1999.

BANIWAL, S. K. et al. Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors, **Journal Biosciences**, v. 29, p. 471-487, 2004.

BASTOS, C. N. Epifitologia, hospedeiros e controle de vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer), Ilhéus: CEPLAC/CEPEC, 21p. (boletim técnico, 168). 1990.

BROWN P.O.; BOTSTEIN, D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. **Nature Genetics**, v. 21, p. 33–37, 1999.

CEITA, G.O. 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.

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

CHEN, Y. et al. Assessment of a method for detecting serum HBV DNA with HBV DNA probe labeled directly by alkaline phosphatase. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v. 2, n. 4, p. 553-556, 2003.

CHEONG, Y.H. et al. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 129, p. 661-677, 2002.

CHISHOLM, et al. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. **Cell**, v. 124, p. 803-814, 2006.

COLON, L. T.; JANSEN, R. C.; BUDDING, D. J. Partial resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in hybrid progenies of four South American Solanum species crossed with diploid *S. tuberosum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 90, p. 691-698, 1995.

DABBAS, K. M. et al. Genes diferencialmente expressos em cana-de-açúcar inoculada com *Xanthomonas albilineans*, o agente causal da escaldadura da folha. **Summa Phytopathology**, v. 32, n. 4, p. 328-338, 2006.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, p. 826-833, 2001.

DAWES, N.; GLASSEY J. Normalisation of Multicondition cDNA Macroarray Data. **Comparative and Functional Genomics**, v. 2007, 90578, 2007.

DEEPAK, S. et al. Purification and characterization of proline/hydroxyproline-rich glycoprotein from pearl millet coleoptiles infected with downy mildew pathogen *Sclerospora graminicola*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 3, p. 298-305, 2007

DEMPSEY D. A.; SILVA H.; KLESSIG D. F. Engineering disease and pest resistance in plants. **Trends in Microbiology**, v. 6, p. 54-61, 1998.

DESENDER, D.; ANDRIVON, D.; VAL, F. Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity? **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 21-30, 2007.

DIAS, L. A. S. (org). **Melhoramento genético do cacaueteiro**. Viçosa: FUNAPE/UFG, 2001, 578p.

DIATCHENKO L. et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 93, p. 6025-6030, 1996.

DONG, X. Genetic dissection of systemic acquired resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 309–314, 2001.

DUGGAN, D. J. et al. Expression profiling using cDNA microarrays. **Nature Genetics**, v. 21, p. 10-14, 1999.

EICHMANN, R. et al. Macroarray expression analysis of barley susceptibility and nonhost resistance to *Blumeria graminis*. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 657-670, 2006.

EISEN, et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 95, p. 14863-603014868, 1998.

ESTEVEZ, G. H. **Métodos estatísticos para a análise de dados de cDNA microarray em um ambiente computacional integrado**. 2007.174 f. Tese (Doutorado em Bioinformática) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

FALEIRO, F. G. et al. Mapping QTLs for Witches' Broom (*Crinipellis pernicioso*) Resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). **Euphytica**, v. 149, p. 227-235, 2006.
FRIAS G. A.; PURDY L. H.; SCHMIDT R. A. An inoculation method for evaluating resistance of cacao to *Crinipellis pernicioso*. **Plant Disease**, v. 79, p. 787-791, 1995.

FLOR, H. H. Current Status of the Gene-for-gene Concept. **Annual Review Phytopathology**, v. 9, p. 275-296, 1971.

FULLER, V. L. Differential gene expression in Arabidopsis following infection by plant-parasitic nematodes *Meloidogyne incognita* and *Heterodera schachtii*. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 5, p. 595-609, 2007.

GARCIA et al. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, v. 111, n. 4, p. 443-455, 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 pernicioso*. **BioTechniques**, v. 35, p. 494-500, 2003.

GESTEIRA, A. S. et al. Comparative Analysis of Expressed Genes from Cacao Meristems Infected by *Moniliophthora pernicioso*. **Annals of Botany**, p. 1-12, 2007.

GLAZEBROOK, J. et al. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. **The Plant Journal**, v. 34, p. 217-228, 2003.

GONZÁLEZ, J. et al. *Arabidopsis thaliana*: A model host plant to study plant-pathogen interaction using Chilean field isolates of *Botrytis cinerea*. **Biological Research**, v. 39, p. 221-228, 2006.

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

GU, K. et al. R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. **Nature**, v. 435, p. 1122-1125, 2005.

- GUEST, D. Black Pod: Diverse Pathogens with a Global Impact on Cocoa Yield. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1650-1653, 2007.
- HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Inducible plant defence mechanisms and resistance gene function. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1773-1791, 1996.
- HEBBAR, P. K. Cacao diseases: A global perspective from an industry point of view. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1658-1663, 2007.
- HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 986-994, 1996.
- HERWIG, R. et al. Statistical evaluation of differential expression on cDNA nylon arrays with replicated experiments. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 23, p. 2-9, 2001.
- HUANG, Z. et al. Salicylic Acid-Dependent Expression of Host Genes in Compatible *Arabidopsis*-Virus Interactions. **Plant Physiology**, v. 137, p. 1147-1159, 2005.
- ISHIHARA, T. et al. Comparative Analysis of Expressed Sequence Tags in Resistant and Susceptible Ecotypes of *Arabidopsis thaliana* Infected with Cucumber Mosaic Virus. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 4, p. 470-480, 2004.
- JAMMES, F. et al. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 44, p. 447-458, 2005.
- JONES, P. G. et al. Gene discovery and microarray analysis of cacao (*Theobroma cacao* L.) varieties. **Planta**, v. 216, p. 255-264, 2002.
- KATAGIRI, F. A global view of defense gene expression regulation - a highly interconnected signaling network. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7. P. 506-511, 2004.
- KAZAN, K. et al. DNA microarrays: new tools in the analysis of plant defence responses. **Molecular Plant Pathology**, v. 2, n. 3, p. 177-185, 2001.
- KHAN, R. et al. Microarray Analysis of Gene Expression in Soybean Roots Susceptible to the Soybean Cyst Nematode Two Days Post Invasion. **Journal of Nematology**, v. 36, n. 3, p. 241-248, 2004.

KILARU, A.; HASENSTEIN, K. H. Development and pathogenicity of the fungus *Crinipellis pernicioso* on interaction with cacao leaves. **Phytopathology**, v. 95, n. 1, p. 101-107, 2005.

KRAUSS, U.; SOBERANIS, W. Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. **Biological Control**, v. 24, p. 82-89, 2002.

KUANG, H. et al. Multiple Genetic Processes Result in Heterogeneous Rates of Evolution within the Major Cluster Disease Resistance Genes in Lettuce. **The Plant Cell**, v. 16, p. 2870–2894, 2004.

KUDLA, J. et al. Genes for calcineurin B-like proteins in Arabidopsis are differentially regulated by stress signals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 4718–4723, 1999.

KUHN, E. From Library Screening to Microarray Technology: Strategies to Determine Gene Expression Profiles and to Identify Differentially Regulated Genes in Plants. **Annals of Botany**, v. 87, p. 139-155, 2001.

LEAL JR, G. A.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; FIGUEIRA A. Genes diferentially 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.

LEE, S. et al. EST and microarray analyses of pathogen-responsive genes in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) non-host resistance against soybean pustule pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. glycines). **Functional & Integrative Genomics**, v. 4, p. 196-205, 2004.

LI, G. et al. A macroarray expression analysis of novel cDNAs vital for growth initiation and primary metabolism during development of *Heterobasidion parviporum* conidiospores. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 1340–1350, 2006.

LIMA L. S. et al. Characterization of microsatellites from cacao-*Moniliophthora pernicioso* interaction expressed sequence tags. **Molecular Breeding**, no prelo.

LOCKHART, D. L. et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 1675-1680, 1996.

LOPEZ, F. Feature extraction and signal processing for nylon DNA Microarrays. **BMC Genomics**, v. 5, n.38, 2004. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/5/38>>.

LUAN, S. et al. Calmodulins and Calcineurin B-like Proteins: Calcium Sensors for Specific Signal Response Coupling in Plants. **Plant Cell**, v. 14, p. 389-400, 2002.

MALECK, K. et al. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. **Nature Genetics**, v. 26, p. 403-410, 2001.

MAOR, R.; SHIRASU, K. The arms race continues: battle strategies between plants and fungal pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 399-404, 2005.

MARTIN, G. M.; BOGDANOVA, A. J.; SESSA, G. Understanding the Functions of Plant Disease Resistance Proteins. **Annual Review Plant Biology**, v. 54, p. 23-61, 2003.

MAXIMOVA, S. N. et al. Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Coletotrichum gloeosporioides*. **Planta**, v. 224, p. 740-749, 2006.

MCHALE, et al. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. **Genome Biology**, v. 7:212, 2006. Disponível em: <<http://genomebiology.com/2006/7/4/212>>.

MEINHARDT, L. W. et al. In Vitro Production of Biotrophic-Like Cultures of *Crinipellis perniciosas*, the Causal Agent of Witches' Broom Disease of *Theobroma cacao*. **Current Microbiology**, v. 52, p. 191-196, 2006.

MELO, S. A. et al. Fungus resistance to PR-10 from *Theobroma cacao* depends on protein exportation via active multi-drug efflux pump Snq1/Atr1. Aceito com revisões em **Molecular Plant-Microbe Interactions**

MESKIENE, I et al. Stress-induced Protein Phosphatase 2C is a Negative Regulator of a Mitogen-activated Protein Kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n.21, p. 18945-18952. 2003

MEYERS, B. C. et al. Receptor-like Genes in the Major Resistance Locus of Lettuce Are Subject to Divergent Selection. **The Plant Cell**, v. 11, p. 1833-1846, 1998.

MOZORUK et al. Profiling transcriptional changes in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck challenged by herbivory from the xylem-feeding leafhopper *Homalodisca coagulata* (Say) by cDNA macroarray analysis. **Plant Science**, v. 170, p. 1068-1080. 2006.

MUSE, R. B. et al. Effects of the fungus *Crinipellis perniciosas*, causal agent of witches' broom disease, on cell and tissue cultures of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Plant Pathology**, v. 45, p. 145-154, 1996.

NGUYEN, C. et al. Differential Gene Expression in the Murine Thymus Assayed by Quantitative Hybridization of Arrayed cDNA Clones. **Genomics**, v.29, n. 1, p. 207-216, 1995

PEREIRA, J. L.; ALMEIDA, L. C. C.; SANTOS, S. M. Witches' broom disease of cocoa in Bahia: attempts at eradication and containment. **Crop Protection**, v. 15, n. 8, p. 743-752, 1996.

PERRET, E., et al. Improved differential screening approach to analyse transcriptional variations in organized cDNA libraries. **Genes**, v. 208, p. 103-115, 1998.

PHILLIPS-MORA, W.; WILKINSON, M. J. Frosty Pod of Cacao: A disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1644-1647, 2007.

PLOETZ, R. C. cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1634-1639, 2007.

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

QUEIROZ, V. T. et al. Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. **Plant Breeding**, v. 122, p. 268-272, 2003.

RAY, S. et al. Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Plant Molecular Biology**, v. 53, p. 741-754, 2003.

RAUYAREE, P. et al. Genes expressed during early stages of rice infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant Pathology**, v. 2, n. 6, p. 347-354, 2001.

REYMOND, P. DNA microarrays and plant defence. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 39, p. 313-321, 2001

RINCONES, J. et al. Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* from various plant hosts in South America. **Mycological Research**, v. 110, p. 821-832, 2006.

RISTERUCCI, A.M. et al. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, p. 948–955, 2000.

ROS, B.; THÜMMLER, F.; WENZEL, G. Analysis of differentially expressed genes in a susceptible and moderately resistant potato cultivar upon *Phytophthora infestans* infection. **Molecular Plant Pathology**, v.5, n. 3, p. 191-201, 2004.

RUAN, Y.; GILMORE, J.; CONNER, J. Towards Arabidopsis genome analysis: monitoring expression profile of 1400 genes using cDNA microarrays. **The Plant Journal**, v. 15, n. 6, p. 821-833, 1998.

RUSHTON P. J.; SOMSSICH I. E. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 1, p. 311–315, 1998.

SASAKI, Y. et al. Monitoring of Methyl Jasmonate-responsive Genes in *Arabidopsis* by cDNA Macroarray: Self-activation of Jasmonic Acid Biosynthesis and Crosstalk with Other Phytohormone Signaling Pathways. **DNA Research**, v. 8, p. 153–161, 2001.

SCARPARI, L. M. et al. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-13, 2005.

SCHEIDELER, M. et al. Monitoring the Switch from Housekeeping to Pathogen Defense Metabolism in *Arabidopsis thaliana* Using cDNA Arrays. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 12, p. 10555-10561, 2002.

SCHENA, M. et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v. 270, p. 467-470, 1995.

SCHENK, P. M. et al. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 11655-11660, 2000.

SCHNELL, R. J. et al. Development of a Marker Assisted Selection Program for Cacao. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1664-1669, 2007.

SCHWEIGHOFER, A. et al. The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.19, p. 2213-2224, 2007.

SHI, J. et al. Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 11, p. 2393–2405, 1999.

SHOWALTER, A. M. et al. Accumulation of hydroxyproline-rich glycoprotein mRNAs in response to fungal elicitor and infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 6551-6555, 1985.

SHOWALTER, A. M. Structure and function of plant cell wall proteins, **Plant Cell**, v. 5, p. 9-23, (1993)

SILVA, S. D. V. M.; MATSUOKA, K. Histologia da Interação *Crinipellis pernicioso* em Cacaueiros Suscetível e Resistente à Vassoura de Bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 54-59, 1999.

SKIBA, B.; FORD, R.; PANG, E. C. K. Construction of a cDNA library of *Lathyrus sativus* inoculated with *Mycosphaerella pinodes* and the expression of potential defence-related expressed sequence tags (ESTs). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 66, p. 55-67, 2005.

SREENIVASAN, T. N.; DABYDEEN, S. Modes of Penetration of Young Cocoa Leaves by *Crinipellis pernicioso*. **Plant Disease**, v. 73, n. 6, p. 478-481, 1989.

SURUJDEO-MAHARAJ, S. et al. An optimised screening method for identifying levels of resistance to *Crinipellis pernicioso* in cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology**, v. 52, p. 464–75, 2003;

TUNLID, A. Exploring plant–microbe interactions using DNA microarrays. **New Phytologist**, v. 158, p. 227–238, 2003.

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

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

VELCULESCU, V. E. et al. Serial analysis of gene expression. **Science**, v. 270, p. 484-487, 1995.

VERICA, J. A. et al. Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 404-413, 2004.

WAN, J.; DUNNING, F. M.; BENT, A. F. Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays. **Functional & Integrative Genomics**, v. 2, p. 259-273, 2002.

WANG, E. RNA amplification for successful gene profiling analysis. **Journal of Translational Medicine**, v. 3, n. 28, 2005. Disponível em: <<http://www.translational-medicine.com/content/3/1/28>>.

WANG, B., et al. Monitoring the expression patterns of potato genes associated with quantitative resistance to late blight during *Phytophthora infestans* infection using cDNA microarrays. **Plant Science**, v. 169, p. 1155-1167, 2005.

WILLE, A. et al. EVE (external variance estimation) increases statistical power for detecting differentially expressed genes. **The Plant Journal**, v. 52, n. 3, p. 561-569, 2007.

WISE, R. P. et al. Transcript Profiling in Host-Pathogen Interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 45, p. 329-369, 2007.

WU, et al. Comparison of normalization methods for CodeLink Bioarray data. **BMC Bioinformatics**, v. 6:309, 2005. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2105/6/309>>.

YANG, Y. et al. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. **Nucleic Acid Research**, v. 30, p. 4-15, 2002.

YANG, B. et al. Transcriptional profiling of canola (*Brassica napus* L.) responses to the fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Science**, v. 173, p. 156-171, 2007.