

**EXPRESSÃO QUANTITATIVA DE GENES RELACIONADOS À
DEFESA INDUZIDA EM *Theobroma cacao* POR BION® E AGRO-
MOS® CONTRA *Crinipellis perniciosa***

LÍVIA DE MATOS PEREIRA

2008

LÍVIA DE MATOS PEREIRA

**EXPRESSÃO QUANTITATIVA DE GENES RELACIONADOS À
DEFESA INDUZIDA EM *Theobroma cacao* POR BION® E AGRO-
MOS® CONTRA *Crinipellis pernicioso***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Pereira, Livia de Matos.

Expressão quantitativa de genes relacionados à defesa induzida em
Theobroma cacao por Bion[®] e Agro-Mos[®] contra *Crinipellis perniciosa* /
Livia de Matos Pereira. – Lavras : UFLA, 2008.

52 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende

Bibliografia.

1. Peroxidase. 2. Quitinase. 3. Resistência induzida. 4. Indutores de
resistência. 5. RT-qPCR

CDD – 583.190488

LÍVIA DE MATOS PEREIRA

**EXPRESSÃO QUANTITATIVA DE GENES RELACIONADOS À
DEFESA INDUZIDA EM *Theobroma cacao* POR BION® E AGRO-
MOS® CONTRA *Crinipellis perniciosa***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do Curso de
Mestrado em Agronomia, área de concentração em
Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de
“Mestre”.

APROVADA em 30 de abril de 2008

Profª. Dra. Magnólia de Araújo Campos UFLA

Profª. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho UFLA

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela Resende

UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus, pela vida, pela força e coragem, pela oportunidade e por iluminar meu caminho.

Aos meus pais, Antônio Alvim e Elisa, grandes responsáveis pela minha formação, pelo exemplo de vida, dedicação, incentivo e apoio.

As minhas irmãs, Elise e Débora, pelo companheirismo e confiança. Ao Felipe, por existir e alegrar os meus dias.

Ao Eduardo, pelo amor e carinho, pela compreensão e apoio, em todos os momentos.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende, pela orientação, competência e por ter acreditado no meu trabalho.

À Dra. Magnólia de Araújo Campos, pela confiança, estímulo, dedicação, amizade e valiosos ensinamentos, imprescindíveis a minha formação.

Ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis, SP; à Dra. Alessandra Alves Souza e ao Adriano Malosso, pelas valiosas discussões, assistência e disponibilização da máquina de RT-qPCR.

Ao Dr. Miguel Angel Dita Rodriguez, pelo apoio, sugestões e auxílio.

Ao Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva, coordenador do Curso de Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade.

À Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, pelo incentivo.

Aos “Andersons”, Tadeu e Ramos, pelo apoio constante, otimismo e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, Departamento de Fitopatologia, especialmente Pedro, João de Cássia, Fabrício e Daniel, pelo auxílio e colaboração desde o início deste trabalho, que foram essenciais para esta conquista.

Aos colegas e amigos de curso e do Laboratório Central de Biologia Molecular, pela agradável convivência, especialmente Elizângela, pelo companheirismo, apoio e amizade.

Aos professores, pelos conhecimentos transmitidos.

A todos aqueles que acreditaram em mim e que, de alguma forma, contribuíram com esta conquista.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCILA TEÓRICO	4
2.1 Importância de Crinipellis perniciososa sobre Theobroma cacao	4
2.2 Resistência Induzida em Plantas contra Patógenos	5
2.3 Genes Relacionados à Defesa	9
2.4 Indutores da Resistência de Plantas	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Material Genético	20
3.2 Produção de inóculo de Crinipellis perniciososa	20
3.3 Bioensaio de Indução de Resistência em Cacaueiro e Desafio com C. perniciososa	20
3.4 Extração de RNA Total de Cacaueiro	22
3.5 Tratamento do RNA total com DNase I	23
3.6 Síntese de cDNA	23
3.7 Análise quantitativa em tempo real da expressão de genes de defesa por Reverse Transcriptase-PCR (RT-qPCR)	24
3.7.1 Desenho de primers para genes peroxidases e quitinases	24
3.7.2 Rt-qPCR	25
3.8 Análise Estatística	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Alterações na expressão quantitativa relativa dos genes <i>POD</i> e <i>CHI</i> em cacaueiro após indução por Bion® e Agro-Mos®	27
4.2 Alterações no perfil de expressão quantitativa relativa de genes <i>POD</i> e <i>CHI</i> em cacaueiro após indução por Bion® e Agro-Mos® e inoculação com Crinipellis perniciososa	29

4.3 Alterações no perfil de expressão quantitativa relativa dos genes <i>POD</i> e <i>CHI</i> em cacauero, causadas pelo efeito aditivo de indutor e inoculação com <i>Crinipellis pernicios</i>	31
5 DISCUSSÃO	34
5.1. Genes <i>POD</i> e <i>CHI</i> são ativados em cacauero após indução por Bion® e Agro-Mos®	34
5.2. Expressão de genes <i>POD</i> e <i>CHI</i> em cacauero induzido por Bion® e Agro-Mos® é potencializada pela inoculação com <i>Crinipellis pernicios</i>	36
5.3. Mudanças de cacauero suscetível respondem à presença do patógeno ativando genes <i>POD</i> e <i>CHI</i> e efeito aditivo na expressão é visualizado na presença de indutores e patógeno	38
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
7 CONCLUSÕES	42
8 REFERÊNCIAS	43

RESUMO

PEREIRA, Livia de Matos. **Expressão quantitativa de genes relacionados à defesa induzida em *Theobroma cacao* por Bion® e Agro-Mos® contra *Crinipellis perniciosa***. 2008. 52 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal)* – Universidade Federal de Lavras, Lavras*.

A vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa*, é considerada uma das principais enfermidades do cacaueteiro (*Theobroma cacao*). Os danos provocados por ela transformaram o Brasil de país exportador para importador de cacau. A indução de genes relacionados com a defesa representa um dos melhores marcadores para se estudar a ativação de defesa mediada por eliciadores. O objetivo da realização deste trabalho foi analisar a expressão gênica quantitativa por RT-qPCR de genes relacionados à defesa, *POD* e *CHI*, induzida em cacaueteiro por meio de dois indutores de resistência, Bion®, como padrão comercial e Agro-Mos® e desafiadas com *Crinipellis perniciosa*. Os genes do tipo *POD* e *CHI* foram induzidos em cacaueteiro pelo tratamento com os indutores de resistência Bion® ou Agro-Mos®, porém, levando a perfis de expressão bastante distintos. Dois picos máximos de expressão de ambos os genes foram observados, indicando a detecção da síntese *de novo*. A expressão gênica induzida por Bion® ocorreu mais rapidamente do que aquela induzida por Agro-Mos®. A expressão dos genes foi potencializada pelo patógeno em mudas de cacaueteiro induzida, com possível efeito *priming*, que revelou ser diferente entre os indutores, entre os genes expressos e entre o perfil de expressão ao longo do tempo. O genótipo suscetível de cacaueteiro cv. Catongo não induzido responde à presença do patógeno com aumentos nos níveis de expressão dos genes *POD* e *CHI*. Entretanto, os níveis de genes *POD* se mantêm elevados, enquanto os de genes *CHI* foram silenciados na presença do patógeno ao longo dos dias. O efeito aditivo do indutor mais *C. perniciosa* sobre a expressão de ambos os genes foi observado somente no momento da inoculação com o patógeno. Com base nos resultados apresentados, ficou claro o potencial do Agro-Mos® em estimular genes de defesa, provavelmente numa cascata não específica e ainda não bem caracterizada, que deve ser diferente daquela induzida por Bion®.

*Comitê Orientador: Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela Resende (Orientador); Dra. Magnólia de Araújo Campos – UFLA

Palavras-chave: peroxidase, quitinase, resistência induzida, indutores de resistência, RT-qPCR.

* Comitê Orientador: Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela Resende (Orientador); Dra. Magnólia de Araújo Campos – UFLA.

ABSTRACT

PEREIRA, Livia de Matos. **Quantitative expression of defense-related genes induced in *Theobroma cacao* by Bion® and Agro-Mos® inducers against *Crinipellis pernicioso***. 2008. 52p. Dissertation (Master in Plant Biotechnology)* – University Federal of Lavras, Lavras-MG*.

Cocoa witches' broom disease caused by the fungus *Crinipellis pernicioso* is considered the main disease on cocoa (*Theobroma cacao*), which damaged led Brazil from an exporter to an importer country of cocoa beans. The induction of defense-related genes represents the best molecular markers to study elicitor-mediated defense activation. The objective of this research was to analyze the quantitative gene expression of defense-related genes (*peroxidase* and *chitinase*) induced by Bion® and Agro-Mos® in inoculated or uninoculated cocoa plants, by using RT-qPCR. *POD*- and *CHI*-like genes were induced in cocoa plants by both resistance inducers, but leading to quite distinct expression profiles. It was observed two expression peaks for both genes, indicating the detection of the *de novo* synthesis. Gene expression induced by Bion® occurred more rapidly than that induced by Agro-Mos®. In addition, a potentiation in expression of the genes was observed to be caused by the pathogen infection, showing putative *priming* effect, which revealed to be different between inducers, genes, as well as the expression profile during the analyzed period. Non-induced susceptible genotype “cv Catongo” responded to the pathogen with enhanced levels of *POD* e *CHI* gene expression; however levels of *POD* were kept high while *CHI* levels were suppressed by the pathogen. The potential of the Agro-Mos® to stimulate the expression of defense genes, probably occurred in an inespecific cascade not yet well characterized, which may be different to the Bion®-induced cascade.

Key-words: peroxidase, chitinase, induced resistance, resistance inducers, RT-qPCR.

*Guidance Committee: Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela Resende (Orientador); Dra. Magnólia de Araújo Campos – UFLA

1 INTRODUÇÃO

A vassoura-de-bruxa, causada por *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, principal doença do cacauzeiro (*Theobroma cacao*) no Brasil, teve uma explosiva disseminação pelas lavouras do sul da Bahia a partir de 1989. Ela é capaz de ocasionar perdas de até 90% da produção (Ferreira, 1997).

O fungo ataca, principalmente, os tecidos meristemáticos em crescimento, provocando sintomas característicos de desequilíbrio hormonal na interação patógeno-hospedeiro. A ocorrência da doença em lavouras brasileiras levou o país, de grande exportador de amêndoas de cacau, a importador, para suprir a demanda das indústrias de moagem nacional. Nos países produtores da América, estima-se que as perdas decorrentes do ataque do patógeno alcancem cerca de 250.000 toneladas ano⁻¹ (Bowers et al., 2001).

Além da importância econômica e social da cultura do cacau para o Brasil, principalmente na região sul da Bahia, é relevante sua importância no aspecto conservacionista, uma vez que as plantas necessitam de sombra para se desenvolver, auxiliando na conservação da Mata Atlântica (Brito, 2005). Dessa maneira, a contínua pesquisa visando à produção de tecnologias de combate à doença é imprescindível para a sustentação e a rentabilidade do agronegócio cacauzeiro nas regiões produtoras.

Os métodos de controle genético, cultural, químico e biológico inseridos no manejo integrado de doenças são medidas recomendadas para o controle da vassoura-de-bruxa (Luz et al., 1997; Costa et al., 2006). Recentemente, métodos alternativos têm sido propostos, incluindo a busca de fungicidas naturais, principalmente à base de extratos vegetais (Bastos, 1997) e a resistência induzida (Resende et al. 2000; 2002b).

A resistência induzida (RI) pode ser ativada em plantas por uma série de substâncias, evitando ou atrasando a entrada ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos, por meio de mecanismos de defesa próprios (Athayde Sobrinho et al., 2005; Nojosa et al., 2005). Vários agentes podem induzir a produção de “sinais” no tecido vegetal, disparando reações de defesa contra uma ampla gama de fitopatógenos. A percepção se dá quando moléculas do indutor se ligam a moléculas receptoras situadas, provavelmente, na membrana plasmática da célula vegetal. Essas reações desencadeiam a ativação de vários mecanismos de defesa (Resende et al., 2002a,b). A RI pode ser dividida em duas categorias, a resistência sistêmica adquirida (SAR) e a resistência sistêmica induzida (ISR) (Van Loon et al., 1998).

A SAR pode ser induzida após a morte celular, denominada reação de hipersensibilidade, provocada em plantas por patógenos causadores de necrose ou pela aplicação de ácido salicílico (AS), ou compostos análogos sintéticos, como o acibenzolar-S-metil (ASM) e ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), desenvolvendo resistência localizada ou sistemicamente. Neste caso, a resistência ocorre, geralmente, pela ativação de genes que codificam uma série de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR) e enzimas envolvidas na síntese de fitoalexinas e lignina (Vidhyasekaran, 1988). Muitas delas têm atividade antimicrobiana e são excelentes marcadores moleculares para a resposta de resistência. Já na ISR, geralmente induzida por rizobactérias, a sinalização é mediada pelo ácido jasmônico e o etileno (Van Loon et al., 1998).

As proteínas PR abrangem 17 famílias de proteínas com características variadas (quitinases, β -1,3-glucanases, lisozimas, peroxidases e osmotinas, dentre outras), mas com o fato em comum de estarem todas relacionadas aos processos de defesa durante a patogênese. Dessa forma, apresenta potencial para serem exploradas nos programas de indução de proteção em plantas (Van Loon et al., 1999; Van Loon et al., 2006).

Para validar um composto como indutor de resistência é necessário comprovar sua eficiência em induzir resistência em plantas, similar à mediada por patógenos. Para tanto, marcadores da expressão de genes e ou o acúmulo de proteínas de SAR são comumente utilizados. Neste contexto, este trabalho foi realizado com o objetivo de analisar a expressão gênica quantitativa de genes relacionados à defesa induzida, *peroxidase - POD* e *quitinase - CHI*, em cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.), por meio de dois indutores de resistência, Bion®, como padrão comercial e Agro-Mos®, e desafiadas com *Crinipellis pernicioso*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância de *Crinipellis pernicioso* sobre *Theobroma cacao*

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.), pertencente à família Malvaceae, é uma árvore tropical nativa das florestas úmidas das Américas do Sul e Central (Wood & Lass, 1985). No entanto, atualmente, é cultivado em mais de 5 milhões de hectares em regiões tropicais úmidas ao redor do mundo (Verica, 2004).

A principal região produtora de cacau no Brasil localiza-se no sul da Bahia, onde a cultura chegou a abranger 600 mil ha, gerando 300 mil empregos diretos, até a chegada da doença conhecida como vassoura-de-bruxa, em 1989, que levou à destruição da lavoura baiana (Peres Filho, 1998). Como consequência, o país passou de exportador da matéria-prima fundamental para as indústrias de chocolates, para importador, em poucos anos.

A vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, é considerada uma das principais enfermidades do cacauzeiro nas Américas e no Caribe, devido à sua ampla distribuição e à falta de controle químico adequado (Motilal et al., 2003). O fungo infecta tecidos meristemáticos, causando hiperplasia e hipertrofia, perda de dormência apical, proliferação de brotos e raízes axilares, o que resulta numa anormalidade da haste denominada vassoura-verde (Brito, 2005), sintoma característico da doença. A infecção de almofadas florais leva à produção de flores anormais e frutos partenocárpicos. As infecções nos frutos em desenvolvimento causam a perda direta de sementes, sendo a produção de frutos também afetada indiretamente pela infecção de flores e pela redução da área fotossintética, devido à morte dos ramos doentes (Purdy & Smith, 1996).

As medidas de controle recomendadas para vassoura-de-bruxa, atualmente, preconizam a necessidade de um manejo integrado da doença

envolvendo métodos de controle cultural, químico, biológico e genético. Nesse contexto, pesquisas vêm sendo realizadas para encontrar métodos alternativos que possam ser empregados no manejo econômico e com menos impacto ao meio ambiente.

2.2 Resistência induzida em plantas contra patógenos

A resistência de plantas contra patógenos está associada a um conjunto de respostas de defesa ativadas pelo hospedeiro após o contato com agentes patogênicos. A ativação dessas repostas depende da eficiência do hospedeiro em reconhecer a presença do patógeno por meio de mecanismos de percepção e de transdução de sinais. A resistência também pode ser induzida em plantas suscetíveis após a infecção localizada por fitopatógenos ou em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos (Guzzo et al., 2004b).

A resistência induzida (RI) resulta na ativação de mecanismos de defesa próprios da planta, associada à expressão de genes de defesa, evitando ou atrasando a entrada e ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos (Athayde Sobrinho et al., 2005; Nojosa et al., 2005). No processo de preparo das respostas de defesa, as plantas utilizam moléculas transmissoras de sinais que agem como mensageiros secundários que, mesmo em baixas concentrações, podem ativar mecanismos de resistência em células não diretamente invadidas por patógenos. Uma molécula sinalizadora, após o ataque do patógeno, deve aumentar sistematicamente, mover-se na planta, induzir fitoalexinas e proteínas relacionadas à defesa e aumentar a resistência contra patógenos (Moraes, 1998).

Em todos os processos de preparo das respostas de defesa, os mensageiros secundários têm um papel fundamental. Os fitormônios, como ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET), estão envolvidos em uma rede de defesa refinada, eventualmente levando a um ótimo portfólio de

respostas contra invasores. Existem outros mensageiros secundários importantes, como as proteínas-G, inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), diacilglicerol (DAG), cálcio (Ca^{2+}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO) (Resende et al., 2007).

Até o momento, três rotas de sinalização foram identificadas dependentes do AS ou do AJ e ET. A rota dependente do AS pode ser ativada por uma lesão necrótica de um patógeno, induzindo a resistência sistêmica adquirida (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) que confere proteção contra um amplo espectro de patógenos. Duas rotas dependentes do AJ e ET podem conferir resistência contra alguns agentes patogênicos e insetos, incluindo a resistência sistêmica mediada por ferimentos mecânicos ou insetos praga e a resistência sistêmica induzida (*Induced Systemic Resistance*, ISR), a qual pode ser induzida por bactérias não-patogênicas (Custers, 2007).

A SAR está, muitas vezes, relacionada a uma resposta primária de defesa, mediada por um mecanismo de morte celular programada restrita ao local de penetração do patógeno, denominada de resposta de hipersensibilidade (HR- *Hypersensitive Response*). Subseqüentemente, em volta da HR são ativadas as respostas adquiridas locais (*Local Acquired Resistance*, LAR) e sistemicamente, em partes distantes do sítio de infecção do patógeno, a SAR (Campos et al., 2000).

Para que ocorra a SAR, a infecção deve resultar na formação de lesões necróticas ou sintoma da doença (Hammond-Kosack & Jones, 2000). No início do processo infeccioso, as espécies ativas de oxigênio (EAOs) podem acumular-se rapidamente, fenômeno conhecido com explosão oxidativa (Lamb et al., 1989). O acúmulo de EAOs está relacionado a diversas respostas de defesa em plantas, que incluem o efeito tóxico direto sobre o patógeno, inibindo seu desenvolvimento (Peng & Kuc, 1992; Wu et al., 1995), a ativação da HR associada à morte celular (Levine et al., 1994), aumento da taxa de formação de

polímeros de lignina, uma vez que o peróxido de hidrogênio participa da última reação da rota de síntese desta macromolécula (o substrato fenólico é oxidado à lignina, ao mesmo tempo em que o peróxido de hidrogênio é reduzido à água), sendo ainda necessário, para a biossíntese de AS, importante sinalizador de SAR, aumentando a atividade da enzima ácido benzóico-2-hidrolase (BA-2H), que é responsável pela conversão do ácido benzóico em AS (Figura 1) (Hammond-Kosack & Jones, 2000).

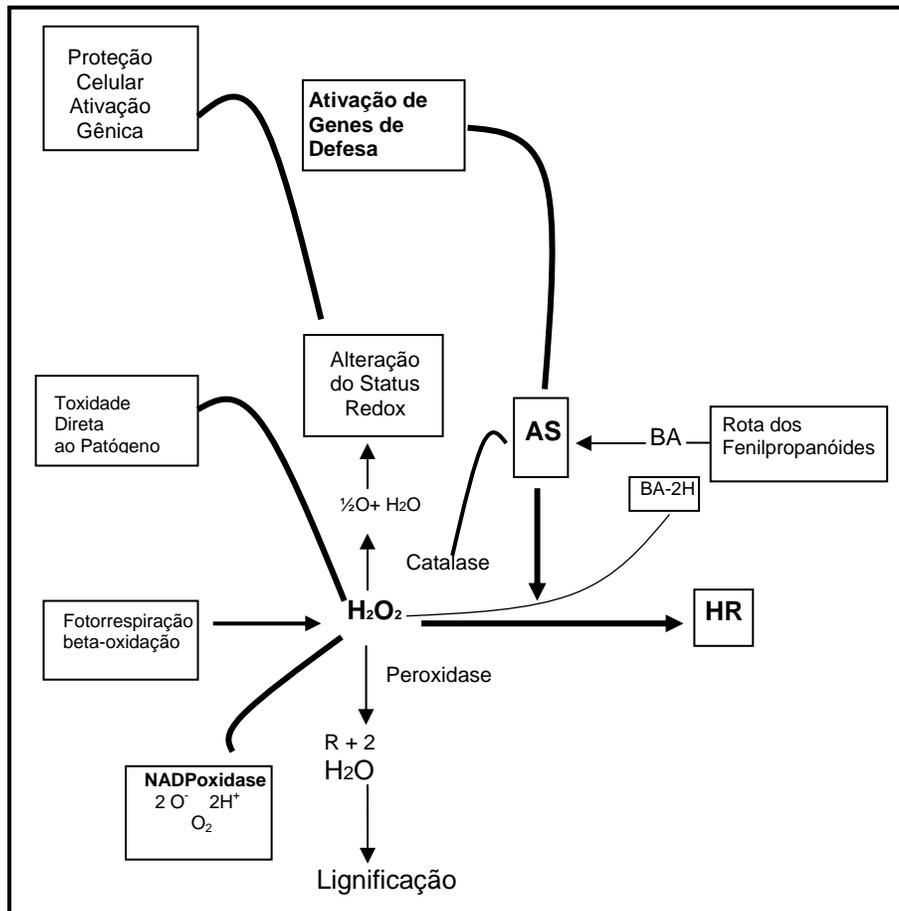


FIGURA 1 Interconexão do H_2O_2 e do AS na ativação e na coordenação das múltiplas respostas de defesa das plantas. HR:

hipersensibilidades, AS: ácido salicílico, BA: ácido benzóico, BA-2H: ácido benzóico 2-hidrolase. Adaptação de Hammond-Kosack & Jones, 2000.

No sítio de infecção do patógeno ocorrem o acúmulo de AS e a formação de sinalização via floema. Subseqüentemente, em tecidos distantes, a concentração de AS é aumentada e ocorre a volatilização do ácido metilsalicílico. Juntos, esses sinais ativam a expressão de um grupo de genes, denominados genes SAR em partes não invadidas da planta (Figura 2) (Hammond-Kosack & Jones, 2000).

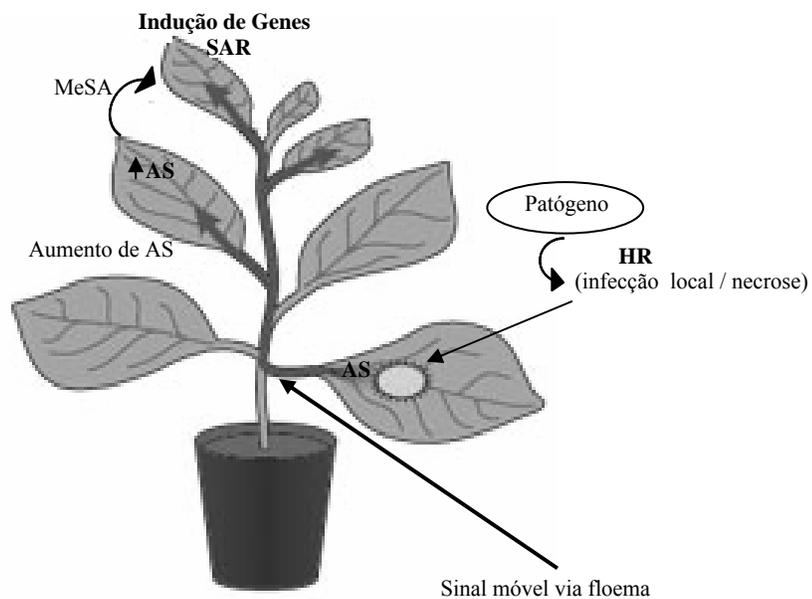


FIGURA 2 Esquema da mobilidade do AS na planta. MeSA (ácido metilsalicílico).

Em estudos foi evidenciado o envolvimento do AS com a SAR, por meio de plantas transgênicas expressando genes NahG, que codificam silicato de hidroxilase, uma enzima que catalisa a conversão do AS em catecol. Assim, foi

possível constatar que não houve acúmulo de AS livre nas plantas transformadas, bem como não houve a expressão de resistência em resposta à infecção patogênica, indicando a necessidade do acúmulo de AS para indução da SAR (Ryals, 1996).

A ativação de SAR resulta no desenvolvimento de uma imunidade natural prolongada em tecidos não infectados, que protege a planta contra o patógeno invasor e contra um amplo espectro de diferentes espécies de patógenos virulentos, como vírus, bactérias, fungos e nematóides (Ryals et al. 1996).

Diante disso, a indução de SAR em plantas contra patógenos mostra-se bastante promissora, caracterizada pela ativação de mecanismos de resistência de caráter multigênico que se encontra em estado de latência nas células vegetais de plantas suscetíveis, podendo proteger a planta durante longo período ou até durante todo seu ciclo vegetativo (Vieira, 2004).

2.3 Genes relacionados à defesa

A ativação da SAR está correlacionada à expressão coordenada de um grupo de genes, denominados genes SAR, tanto em tecidos infectados como em tecidos distantes do sítio de infecção do patógeno, codificando proteínas relacionadas à defesa. As proteínas caracterizadas como SAR têm sua presença ou atividade, seguramente, correlacionadas à manutenção do estado de resistência da planta (Campos et al., 2000).

Diante disso, o acúmulo de proteínas PR na planta é uma das respostas induzidas mais relevantes em interações incompatíveis, estando sua ocorrência associada à resistência induzida. Algumas dessas proteínas têm atividade antifúngica e antibacteriana, sugerindo, assim, a função de proteção contra

doenças em plantas induzidas. Portanto, proteínas PR são frequentemente usadas como marcadores da SAR (Hammerschmidt et al., 2001).

As proteínas PR são definidas como proteínas induzidas na planta hospedeira em situações patológicas, referindo-se a todos os tipos de estados infectados, como resistência, hipersensibilidade ou repostas de suscetibilidade, ataque parasítico por nematóides e ataque de insetos fitófagos e herbívoros, ou situações relacionadas, referindo-se a ferimentos bem como à aplicação de químicos, que imitam os efeitos de infecção por patógenos por meio da indução de algumas respostas de defesa da planta (Van Loon et al., 1997).

Originalmente, proteínas PR foram classificadas com base nas suas características de proteínas vegetais induzidas em situações patológicas ou afins. Proteínas relacionadas, ocorrendo na ausência de infecção por patógeno, foram referidas como sendo proteínas *PR-like* (PRLs). Porém, a distinção entre proteínas PR e PRLs tornou-se obscura pela descoberta de específicas Proteínas PR em tecidos saudáveis e a indução de PRLs após o ataque por patógenos. Sendo assim, o termo PRL não foi aceito pela comunidade científica e o termo “proteínas relacionadas à patogênese” tornou-se coletivo para todas as proteínas induzidas por patógenos e proteínas homólogas, estendendo-se a enzimas como fenilalanina-amônia liase, peroxidase e polifenol oxidase, geralmente presentes constitutivamente e somente aumentadas durante o processo infeccioso ou outro estresse qualquer (Van Loon et al., 2006).

As proteínas PR podem ser induzidas também por fatores ambientais de estresse como seca, salinidade, ferimentos, metais pesados, tratamentos com eliciadores endógenos e exógenos e reguladores de crescimento, como citado por Ferreira e colaboradores (2007).

Proteínas indutíveis relacionadas à defesa foram descritas primeiramente por meio da reação de hipersensibilidade de fumo a *Tabaco Mosaic Vírus*

(TMV) e, posteriormente, demonstradas em, pelo menos, outras 13 famílias de espécies vegetais após infecção por oomicetos, fungos, bactérias, vírus, assim como por nematóides e ataque de insetos (Van Loon et al., 2006).

Existem várias famílias de proteínas PR sob isoformas básicas e ácidas localizadas, respectivamente, nos vacúolos e nos espaços extracelulares. As formas extracelulares têm função imediata na defesa, com ação direta sobre as hifas. Esta ação também provoca a liberação de eliciadores oligossacarídeos, a partir das paredes fúngicas, os quais podem levar à ativação de outros mecanismos de defesa. Já as formas intracelulares certamente atuam tardiamente na defesa (Campos et al., 2000).

Como se pode ser observar, por meio da Tabela 1, 17 famílias de proteínas PR são reconhecidas atualmente, numeradas na ordem em que foram descobertas.

TABELA 1 Famílias reconhecidas de proteínas relacionadas à patogênese

Famílias	Membros representativos	Propriedades
PR-1	PR-1 ^a do fumo	Antifúngica
PR-2	PR-2 do fumo	β-1,3-glucanase
PR-3	P, Q do fumo	Quitinase tipos I,II, IV,V,VI,VII
PR-4	'R' do fumo	Quitinases tipos I,II
PR-5	S do fumo	Tipo taumatina
PR-6	Inibidor I de tomate	Inibidor de proteinase
PR-7	P ₆₉ de tomate	Endoproteinase
PR-8	Quitinase do pepino	Quitinase tipo III
PR-9	Peroxidase formadora de lignina do fumo	Peroxidase
PR-10	'PR1' da salsa	Tipo ribonuclease
PR-11	Quitinase 'classe V' do fumo	Quitinase tipo I
PR-12	Rs-AFP3 de rabanete	Defensina
PR-13	THI2.1 de <i>Arabidopsis</i>	Tionina
PR-14	LTP4 de cevada	Proteína de transferência de lipídeos
PR-15	OxOa (germina) de cevada	Oxalato oxidase
PR-16	OxOLP de cevada	Tipo oxalato oxidase
PR-17	PRp27 de fumo	Desconhecida

Fonte: <http://www.bio.uu.nl/~fytopath/PR-families.htm>

O efeito antifúngico é uma importante característica comum a maioria das proteínas PR, que podem também apresentar efeito antibacteriano, antiviral, nematicida e inseticida. A toxicidade das proteínas PR, geralmente, se dá em função da capacidade de hidrólise, da inibição de proteinases e da permeabilização de membranas. As proteínas PR mais conhecidas são as enzimas líticas quitinases e β -1,3-glucanases (Van Loon & Van Strien, 1999).

As quitinases podem pertencer às famílias PR-1, PR-4, PR-8 e PR-11 e catalisam a hidrólise de quitina, um importante componente da parede celular de fungos. A proporção em que estas hidrolases exercem sua atividade lisozima-quitinase é variável e característica de cada quitinase. A atividade dessas proteínas, especialmente as classes I e IV, é incrementada na presença de β -1,3-glucanases. As β -1,3-glucanases, pertencentes à família PR-2, são capazes de clivar glucana, um outro importante componente estrutural da parede celular (PC) de fungos e oomicetos. Agindo diretamente sobre o patógeno, estas proteínas causam lise da hifa e inibição de crescimento de fungos patogênicos. Atividade indireta dessas proteínas também pode ser obtida por meio da liberação de oligômeros de glucana e quitina, que são eficientes eliciadores de resposta de defesa das plantas (Campos et al., 2002).

As quitinases, as β -1,3-glucanases e as proteinases podem ser um instrumento de enfraquecimento e decomposição de paredes celulares de fungos que contêm glucana, quitina e proteínas (Van Loon & Van Strien, 1999). Plantas transgênicas de cacauero superexpressando o gene da quitinase classe I (*TcChi1*), após inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides*, apresentaram o sintoma da doença reduzido em relação ao controle não transformado. As plantas transgênicas demonstraram a eficácia das proteínas codificadas pelo transgene (*TcChi1*) em inibir o crescimento do patógeno nas folhas de cacauero (Maximova et al., 2006).

Nesse sentido, em estudos com plantas de fumo superexpressando quitinase foi observado aumento na resistência contra *Rhizoctonia solani* (Broglie, 1991). Há relatos, na literatura, de outras plantas transformadas com genes de quitinase que também apresentaram aumento de resistência contra fungos, incluindo tomate, cenoura, pepino, rosa e arroz, conforme Maximova et al. (2006).

Outras proteínas relevantes são as do tipo peroxidase, pertencentes à família PR-9, as quais estão envolvidas com o fortalecimento de parede celular das plantas, catalisando a deposição de lignina em resposta ao ataque de patógenos (Van Loon & Van Strien, 1999). Além disso, as peroxidases têm sido relacionadas com uma variedade de processos relacionados à defesa entre eles HR, *cross-linking* com fenólicos e glicoproteínas, suberização e produção de fitoalexinas (Baysal et al., 2003). A atividade das peroxidases é aumentada sistematicamente, proporcionando, assim, maior capacidade de lignificação após o ataque do patógeno. Uma rápida explosão oxidativa mostra-se fundamental para ativação do processo de lignificação (Van Loon et al., 1994).

A lignina é uma das substâncias mais importantes da parede celular vegetal. Ela é constituída de unidades de fenilpropano, cuja polimerização final ocorre devido à oxidação das hidroxilas dos grupos fenólicos pela enzima peroxidase. A lignina, ou o processo de lignificação, pode interferir no crescimento de patógenos por meio do aumento de resistência da PC à ação de enzimas degradadoras, dificultando a difusão de toxinas produzidas pelo patógeno ao hospedeiro e de nutrientes do hospedeiro em direção ao patógeno. Além disso, patógenos podem também ser lignificados e seu crescimento interrompido, pela formação dos denominados tubos ligníferos (Pascholati & Leite, 1995).

A lignificação também se mostrou importante na resistência da batata a *Phytophthora infestans*, do tomate a *Botrytis cinerea* e do pepino a

Cladosporium cucumerinum. Embora a maioria das pesquisas com deposição de lignina tenha sido conduzida com fungos, existem, ainda, evidências de que o efeito desta e ou de precursores contribuiu com resistência a bactérias e vírus (Pascholati & Leite, 1995).

A aplicação de indutores de resistência em cacaueteiro promoveu uma redução da murcha-de-verticílio, pela redução da severidade da doença, concomitante a um aumento relativo na atividade enzimática de peroxidase (Pereira et al., 2008). Por outro lado, em estudos com plantas transgênicas de tomate contendo o gene que codifica peroxidase TobAnPOD, não foi verificado aumento de resistência contra vários agentes patogênicos (Lagrimini et al., 1993).

2.4 Indutores da resistência de plantas

Resistência induzida (RI) pode ser ativa em plantas por uma série de substâncias, evitando ou atrasando a entrada e a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos por meio de mecanismos de defesa próprios. A percepção se dá por meio da ligação de moléculas eliciadoras a receptores localizados na membrana plasmática da célula vegetal, desencadeando a ativação de mecanismos de defesa, como a síntese de proteínas PR, fitoalexinas e lignificação dos tecidos (Cavalcanti et al., 2004).

As substâncias que induzem reações de defesa em plantas são chamadas de eliciadores (Resende et al., 2007). A SAR pode ser induzida por microrganismos, preparações microbianas ou compostos químicos, conforme Hammerschmidt & Kuc (1995), citados por Cardoso Filho (2003). No entanto, para ser considerado um indutor de SAR, três exigências devem ser satisfeitas: 1) deve induzir resistência contra o mesmo espectro de patógenos que a SAR ativada biologicamente, 2) os compostos e seus metabólitos não devem exibir

atividade antimicrobiana direta e 3) deve ocorrer indução dos mesmos mecanismos bioquímicos observados após a indução da SAR por patógenos (Ryals et al., 1996).

Os eliciadores ou indutores podem ser classificados, quanto à sua origem, em bióticos e abióticos. Os eliciadores abióticos incluem luz UV, íons metálicos e moléculas orgânicas sintetizadas em laboratório (Pascholati & Leite, 1994). Por outro lado, os eliciadores bióticos são produzidos e ou liberados pelo patógeno ou pela planta, como, por exemplo, fragmentos de PC liberados do patógenos devido à ação de enzimas do hospedeiro, ou vice-versa, durante a interação entre eles. Muitos eliciadores já foram isolados de patógenos, como glicoproteínas, oligopeptídeos, carboidratos, lipopolissacarídeos (LPSs) e ácidos graxos, os quais são denominados eliciadores exógenos. Os eliciadores liberados pela planta são chamados de constitutivos ou endógenos, como os oligômeros de parede (Resende et al., 2007).

Oligossacarídeos eliciadores, como quitooligômeros ou acetilquitooligossacarídeos, têm recebido atenção especial como sendo importantes sinalizadores de resposta de defesa em plantas. Especula-se que a ativação de genes de defesa por esses eliciadores seja mediada por receptores. No entanto, pouco se sabe sobre a percepção inicial e as conseqüentes rotas de sinalização envolvidas (Ramonell et al., 2005).

Neste contexto, já foi demonstrado que oligossacarídeos, como quitooligômeros ou acetilquitooligossacarídeos (COS), derivados de parede celular de fungos ou da degradação de quitina insolúvel, podem induzir várias respostas de defesa que incluem produção de fitoalexinas, polimerização de membranas (Kuchitsu et al., 1993), alteração no fluxo de íons (Muller et al., 2000), formação de EAOs (Tsukada et al., 2002), síntese de ácido jasmônico (Nojiri et al., 1996), resposta rápida de genes de defesa (Nishizawa et al., 1999) e indução de enzimas relacionadas à defesa e deposição de lignina (Vander et

al., 1998). Ainda, COS induziu a resposta de defesa em plantas de arroz e aumentos na resistência contra *Magnorpathe grisea* (Ning et al., 2004).

Em outros estudos tem sido relatado o efeito de eliciadores bióticos, como esporos de *Hemileia vastatrix*, inativados e preparados em forma de filtrado aquoso, induzindo proteção contra *H. vastatrix* em cafeeiros e frações desse filtrado demonstraram ação eliciadora de fitoalexina em soja (Guzzo et al., 1987). Tais eliciadores podem ser originados da parede celular do próprio fungo, constituída de moléculas de β -glucana e quitina, responsáveis por disparar respostas de defesa da planta, aumentando os níveis de compostos fenólicos e as atividades de peroxidases e polifenoloxidasas (Maxemiuc-Naccache & Dietrich, 1985, Guzzo et al., 1987).

Há vários relatos de ativadores químicos capazes de induzir resistência em plantas contra patógenos, disponíveis comercialmente, como 1) Bion®, ASM análogo ao AS; 2) Messenger®, cujo ingrediente ativo é uma proteína bacteriana chamada harpina; 3) fosfitos; 4) Elexa®, que tem como componente principal a quitosana; 5) Iodus® 40, formulado à base de elicitores oligossacarídeos contendo β 1-3 glucanas e 6) INA (ácido 2,6 dicloroisnicotínico), assim como ASM é um análogo do AS (Cavalcanti et al., 2004).

Dentre estes, o AS e seus análogos são considerados os mais importantes compostos. AS foi o primeiro composto derivado de plantas a ser demonstrado como indutor de SAR. Posteriormente, o análogo, INA, foi o primeiro composto sintético capaz de induzir SAR. No entanto, AS e INA são tóxicos para a maioria das plantas e, portanto, não apresentam potencial para serem utilizados como indutores (Campos et al., 2000).

O acibenzolar S-metil, ou ASM (nome comercial Bion®), foi o primeiro indutor de SAR liberado para uso comercial (Lyon & Newton, 1997). Este indutor tem ação semelhante ao AS como mensageiro secundário, porém, parece

ser independente do AS ou de qualquer outra molécula sinal, ativando o processo de sinalização e levando à expressão de genes defesa (Benhamou & Bélanger, 1998a).

Há vários relatos sobre o potencial de indução de resistência do ASM em diversas culturas, tais como pepino (Benhamou & Bélanger, 1998a), tomateiro (Benhamou & Bélanger, 1998b; Cavalcanti et al., 2006a), cafeeiro (Guzzo et al., 2004a) e cacauzeiro (Resende et al., 2002b), descritos pela análise da expressão gênica e ou do acúmulo de proteínas de defesa, uma vez que a resistência induzida foi capaz de proteger as plantas contra patógenos.

Em cafeeiro cv. Mundo Novo, o tratamento com ASM levou à expressão de genes relacionados à defesa, bem como de outros genes não previamente implicados em resposta de defesa, com proteção eficiente contra *Hemileia vastatrix* (Guzzo et al., 2004a). Por outro lado, o ASM proporcionou um aumento nas atividades de quitinases e β 1-3 glucanases em tomateiro, com subsequente proteção (43,9%) contra *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (Cavalcanti et al. 2006b). Já em cacauzeiro, a aplicação de ASM proporcionou aumento da atividade da peroxidase e redução significativa da severidade das doenças causada por *Verticillium dahliae* e por *C. perniciosus* (Resende et al., 2002b).

Avanços nas pesquisas envolvendo RI em plantas vêm sendo acompanhados pelo surgimento de novos produtos comerciais que apresentam maior eficácia, estabilidade e menor impacto ao ambiente. Esses produtos são capazes de propiciar melhora na produtividade agrícola, devido à redução de perdas ocasionadas por patógenos e, em alguns casos, incrementos no desenvolvimento vegetativo (Resende et al., 2006).

Neste contexto, outro indutor de resistência sistêmica parcialmente caracterizado é o Agro-Mos®, cujo princípio ativo é um manano-

oligossacarídeo fosforilado, proveniente da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Na sua fórmula também está presente um biocomplexo de cobre totalmente disponível para as plantas (Improcrop do Brasil).

O Agro-Mos® vem sendo utilizado com bons resultados para diversas culturas. O potencial do Agro-Mos® foi avaliado, comparativamente com o ASM, na proteção de frutos de mamoeiro contra podridões causadas por *Lasiodiplodia* e *Fusarium*. Os dois indutores foram eficazes no controle dessas podridões, reduzindo em até 70% das doenças. Entretanto, nos tratamentos com o ASM observou-se ligeiro aumento na incidência das doenças após quatro aplicações, o que não ocorreu nos tratamentos com o Agro-Mos®. Ainda, incrementos na atividade de glucanase foram observados mediante aplicação de ambos os produtos (Dantas et al. 2004). Similarmente, resultados promissores também foram observados nos patossistemas meloeiro-oídio (Mesquita et al., 2005) e tangerina murcote-*Alternaria*, quando o Agro-Mos® foi intercalado com fungicida (Johnston et al., 2005).

Em outros estudos foi demonstrado que Agro-Mos®, aplicado semanalmente na dose de 3 mL/L, teve efeito similar às melhores doses de produtos à base de fosfíto de potássio na redução da incidência do míldio (*Plasmopara viticola*) em videiras da cultivar Merlot (Resende et al., 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material genético

Sementes de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L., cultivar Catongo), provenientes do Centro de Pesquisas do Cacau, CEPEC-CEPLAC, Itabuna, BA, foram sementeadas em bandejas de isopor contendo o substrato Plantmax® e adubadas semanalmente com metade das concentrações da solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950). Durante os experimentos, essas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura de 25±3°C e umidade relativa do ar de, aproximadamente, de 80%, controladas por um sistema automatizado de nebulização no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

3.2 Produção de inóculo de *Crinipellis pernicioso*

Isolado virulento de *Crinipellis pernicioso* foi obtido a partir de ramos infectados, contendo vassouras-de-bruxa, provenientes de Itabuna, BA, gentilmente cedidos por pesquisadores da CEPEC-CEPLAC. Para a produção dos basidiomas, essas vassouras foram mantidas em câmara, sob regime de nebulização periódica, denominada de vassoureiro. A partir dos basidiomas produzidos, foram coletados os basidiósporos em solução de glicerol 16%, conforme Frias et al. (1995) e armazenados em nitrogênio líquido, para posterior inoculação das mudas de cacaueteiro.

3.3 Bioensaio de indução de resistência em cacaueteiro e desafio com *C. pernicioso*

Resistência foi induzida em mudas de cacaueteiro, com 30 dias de idade, por meio de pulverizações com Agro-Mos®, na concentração de 10 mL ingrediente ativo (i.a.)/L ou com ASM, a 0,2 g i.a./L (Bion® 50WG Syngenta),

indutor de resistência efetivo em cacau, conforme Resende et al. (2000, 2002b) e, como testemunha, as pulverizações foram realizadas com água.

Sete dias após pulverização, as mudas foram desafiadas por inoculação com basidiósporos de *C. pernicioso*. Na região do meristema apical de cada muda foi depositada uma gota da suspensão de inóculo na concentração de 1×10^5 basidiósporos viáveis/mL. Durante vinte e quatro horas após o processo de inoculação, a umidade relativa do ar foi mantida próximo a 100%, para propiciar condições à penetração fúngica.

O material vegetal foi coletado nos seguintes tempos após pulverização com indutores e inoculação com o patógeno: 0; 0,5; 1; 2; 4; 7; 7,5; 9 e 11 dias (Figura 1), quatro amostras/tempo/tratamento. Amostras consistindo de epicótilo (parte superior ao cotilédone) foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer, a -80°C , até o momento do isolamento do RNA total e a análise da atividade enzimática.

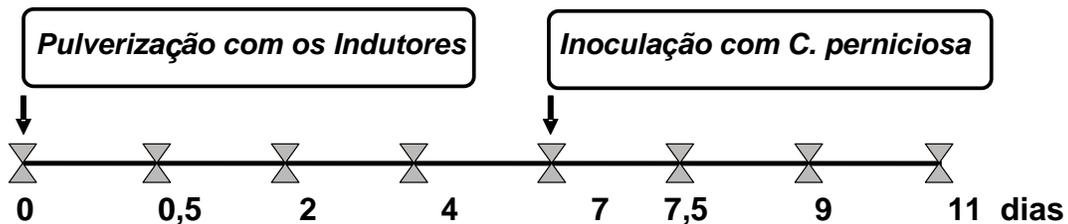


FIGURA 3 Representação esquemática do bioensaio de indução de resistência em cacauero e desafio com *C. pernicioso*, indicando os tempos de coleta.

3.4 Extração de RNA total de cacauero

RNA total foi extraído a partir de 4g de tecido vegetal de cacauero, com base no protocolo proposto pelo Prof. Mark Guiltinan e equipe, da Pennsylvania State University (<http://gultinanlab.cas.psu.edu/Research/Cocoa/protocols.htm>), com alterações. *Pool* das quatro amostras de cada tempo de coleta foi obtido por maceração do tecido vegetal em almofariz com nitrogênio líquido. Em tubos de 50 mL, ao pó fino obtido adicionaram-se tampão de extração (2 % CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), 100m M Tris; 25 mM EDTA; 2 M NaCl; 0,05% espermidina e 2% β -mercaptoethanol, adicionado logo antes do uso). Após homogeneização, a mistura foi incubada a 65°C, por 15 minutos, para rompimento de paredes e membranas celulares. Em seguida, igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foi adicionado e homogeneizado. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, a 4°C, por 30 minutos, promovendo a separação dos ácidos nucleicos. O sobrenadante foi coletado e transferido para novo tubo. A precipitação do RNA foi feita com a adição de 2 mL de 10 M de cloreto de lítio, mantendo-se os tubos durante 16 horas no gelo e posterior centrifugação a 12.000 rpm, a 4°C, por 45 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 10 mL de etanol 75% gelado e centrifugado a 12.000g, a 4°C, por 10 minutos. Essa etapa foi repetida para a eliminação de excesso de sais, porém, com apenas 5 mL de etanol 75% e o pellet secado em câmara de fluxo por, aproximadamente, 20 minutos. O RNA total foi dissolvido em 100 μ L de água milli-Q contendo 0,1% de DEPC (diethylpyrocarbonate) e tratado com inibidor de RNase (RNase OUT™ Invitrogen®). A integridade do RNA foi visualizada em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro “GeneQuant pro” (Amersham Biosciences), a 260nm e armazenadas a -80°C.

Todas as etapas foram realizadas de maneira livre de ribonucleases. Para tanto, os tubos, as ponteiras e as vidrarias, dentre outros, foram tratados com 0,1% de DEPC, por 16 horas, autoclavados e manipulados utilizando-se luvas.

3.5 Tratamento do RNA total com DNase I

As amostras de RNA total foram tratadas com DNase I (New England BioLabs), segundo especificações dos fabricantes, para eliminação de eventual DNA contaminante.

Uma reação contendo 10 µg de RNA total, 2U de enzima DNase I, 10 µL de tampão de reação 10X e água milli-Q DEPC, para completar um volume final de 100 µL, foi incubada a 37°C, temperatura ótima para atividade da enzima, por 30 minutos. Em seguida, o RNA total foi purificado da reação pela adição de 10 µL de 2 M de acetato de potássio, mantendo-se os tubos no gelo durante 15 minutos e centrifugação a 14.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, ao qual se adicionaram 3 volumes de etanol absoluto, para precipitação do RNA, por 2 horas, a -80°C.

Após centrifugação a 14.000 rpm, a 4°C, por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 400 µL de etanol 70%, centrifugado a 14.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. Descartado o sobrenadante, o pellet foi seco em câmara de fluxo, durante, aproximadamente, 10 minutos, para evaporação total do álcool, o qual poderia interferir em futuras reações.

3.6 Síntese de cDNA

A partir dos RNAs tratados com DNase I foi sintetizado cDNA utilizando o kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen), seguindo protocolo sugerido pelo fabricante.

Em tubos estéreis, tratados com DEPC 0,1%, adicionou-se 1 µg de RNA total, 3 µM de *primers* randômicos (Invitrogen) e 10 µM de mistura de dNTP. A mistura foi aquecida a 65°C, por 5 minutos e imediatamente mantida em gelo por 5 minutos. Em seguida, foi centrifugada rapidamente (*spin down*). Ao mesmo tubo foram acrescentados 4 µL do tampão First-Strand 5X e 1 µM de DTT, gentilmente homogeneizados e levados a banho-maria, a 25°C, durante 2 minutos. Adicionaram-se 1 µL da enzima SuperScript II™ 200U/µL e água DEPC 0,1% para completar o volume de 20 µL de reação, incubando-se a 25°C, por 2 minutos e, posteriormente, a 42°C, durante 50 minutos. As amostras foram armazenadas a -20°C.

3.7 Análise quantitativa em tempo real da expressão de genes de defesa por *Reverse Transcriptase-PCR* (RT-qPCR)

3.7.1 Desenho de *primers* para genes *peroxidases* e *quitinases*

Os *primers* utilizados neste estudo foram desenhados com o programa Primer Express (applied Biosystems) e estão descritos na Tabela 1. *Primers* específicos para dois genes do tipo proteínas PR, *peroxidase* e *quitinase*, foram desenhados a partir de seqüências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Transcrito de actina foi escolhido como controle endógeno constitutivo da expressão (Alemanno et al., 2007) RT-PCR convencional, seguida por eletroforese em gel de agarose, realizada para verificar a amplificação de cDNA de cacaueteiro. A especificidade de cada *primer* foi verificada pela presença de bandas únicas e pelo alinhamento com seqüências do banco de dados GenBank, em análise de BLASTn (Altschul et al., 1997).

TABELA 2 *Primers* utilizados e fragmentos amplificados.

Gene	Seqüência	Tamanho do fragmento amplificado
Peroxidase	F- 5'ACTGCCAGTGGGATCCAAAC 3' R- 5' GACCCCGGCCCAAATATTG 3'	58 pb
Quitinase	F- 5' CCACCCTGAGGGCATATTTG 3' R- 5' CCGATCCGAACCTGAACACT 3'	60 pb
Actina	F- 5' GAGCTGAGAGATTCCGTTG 3' R- 5' TAGTTGAACCACCACTGAGC 3'	162 pb

3.7.2 RT-qPCR

A análise da expressão gênica quantitativa por RT-PCR em tempo real foi realizada em sistema de detecção de seqüências ABI PRISM 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems), usando SYBR green, o qual se baseia na capacidade do fluoróforo de intercalar as fitas duplas de cDNA. As condições térmicas da reação foram 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, e finalizando com 15 segundos a 95°C. Os dados foram coletados e armazenados no programa *Sequence Detection Software* (Versão 1.4) que acompanha o equipamento.

Para cada reação, foram utilizados 80ng de cDNA, 1,5 uM de cada *primer* e 6,25 uL de Master Mix SYBR green UDG com ROX (Invitrogen) para um volume final 12,5 uL/amostra. As amostras foram processadas em trélicas. Os resultados foram normalizados usando C_t s obtidos para controle endógeno presente na mesma reação. C_t é definido como o primeiro ciclo de amplificação no qual a fluorescência indica que um produto de PCR é detectado acima do limiar. A normalização foi realizada utilizando-se a equação $\Delta C_t = C_t$ (gene

alvo) - C_t (controle endógeno). A calibração foi determinada pela fórmula $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (amostra) - ΔC_t (calibrador). O calibrador é um valor obtido para uma amostra específica. A quantificação relativa foi obtida pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Para verificar o efeito dos indutores sobre a expressão de cada gene, os cálculos de quantificação relativa foram realizados utilizando-se, como calibrador, os dados obtidos a partir das amostras controle (pulverizadas com água) para um dado tempo de coleta. Já os cálculos de quantificação relativa para verificar o efeito do patógeno sobre a expressão de cada gene em plantas induzidas foram realizados utilizando-se, como calibradores, os dados obtidos a partir das amostras não inoculadas com patógeno por tratamento para um dado tempo.

3.8 Análise estatística

A análise da expressão gênica foi avaliada por teste t – Student, a de 5% de probabilidade, com delineamento inteiramente casualizado (DIC).

4 RESULTADOS

Para estudar a indução de resistência pelo tratamento com Bion® e Agro-Mos® em mudas de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) contra o desenvolvimento de *Crinipellis pernicioso*, RT-qPCR foi utilizado para medir níveis de RNA mensageiro de dois genes marcadores de SAR. O padrão de expressão dos genes *POD* e *CHI* foi avaliado em mudas de cacaueteiro nos seguintes tempos após pulverização com indutores e inoculação com o patógeno: 0; 0,5; 1; 2; 4; 7; 7,5; 9 e 11 dias (Figura 3).

4.1 Alterações na expressão quantitativa relativa dos genes *POD* e *CHI* em cacaueteiro após indução por Bion® e Agro-Mos®

Avaliando-se o efeito dos indutores sem a presença do patógeno, durante os 11 dias de análises, foi possível observar que a expressão quantitativa relativa de genes *POD* em mudas de cacaueteiro nos primeiros tempos (0 e 0,5 DAP) foi maior em mudas tratadas com Agro-Mos® do que aquelas tratadas com Bion®. Entretanto, aos 2 e 4 DAP, observou-se um aumento nos níveis induzidos por Agro-Mos®, que foram estatisticamente menores do que aqueles induzidos por Bion®. Os maiores níveis de expressão foram observados aos 7 e 9 DAP, em mudas induzidas por Bion® e aos 7,5 e 9 DAP em mudas induzidas por Agro-Mos®. Aos 9 DAP, a expressão de genes *POD* induzida por ambos os tratamentos foi igualmente elevada, assim como a queda significativa aos 11 DAP (Figura 4A).

A expressão quantitativa relativa de genes *CHI* em mudas de cacaueteiro tratadas com Bion® foi significativamente maior nos primeiros tempos, 0 e 0,5 DAP, que nas tratadas com Agro-Mos®, tendo, ao 0,5 DAP, havido aumento no nível de transcritos em mudas tratadas com Bion®, que se manteve até os 4 dias. Em mudas de cacaueteiro tratadas com Agro-Mos®, o aumento significativo na

expressão de genes *CHI* ocorreu somente aos 2 DAP, mantendo-se até os 4 DAP. Porém, a partir dos 7 dias, houve decréscimo contínuo nos níveis de transcritos ativados por ambos os indutores, que se estendeu aos 11 dias, que foi inferior aos demais tempos. Os níveis de expressão de genes *CHI* em mudas tratadas com Agro-Mos® foram superiores àqueles induzidos Bion®, dos 4 até os 7,5 DAP, quando mudas tratadas com Bion® aos 9 e 11 DAP apresentaram níveis de transcritos estatisticamente superiores às mudas tratadas com Agro-Mos® (Figura 4B).

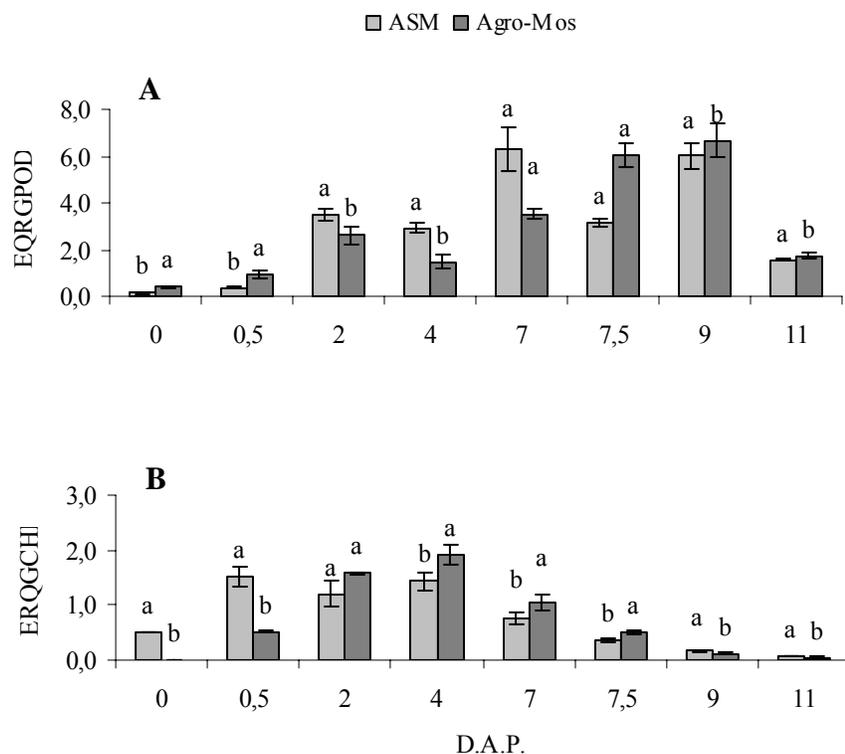


FIGURA 4 - Perfil da expressão quantitativa relativa por real-time PCR (RT-qPCR) dos genes *POD* (A) e *CHI* (B) aos 0, 0,5, 2, 4, 7, 7,5, 9, 11 dias após pulverização com Bion® e Agro-Mos®. Colunas representam a indução média de transcritos gênicos em plantas induzidas relativas ao controle (pulverização com água), no mesmo período, com valores dados a partir de “pool” de RNA de réplicas biológicas. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão de genes *actina*. Médias com a mesma letra por tempo de avaliação não diferem entre si, pelo Teste *t* – Student, a 5% de probabilidade. EQRGPOD (expressão quantitativa relativa de genes *POD*), EQRGCHI (expressão quantitativa relativa de genes *CHI*), DAP (dias após pulverização com os indutores e com água).

4.2 Alterações no perfil de expressão quantitativa relativa de genes *POD* e *CHI* em cacauero, após indução por Bion® e Agro-Mos® e inoculação com *Crinipellis perniciosa*

Analisando o efeito do patógeno em mudas de cacauero tratadas com Bion® ou com Agro-Mos® e inoculadas com *C. perniciosa*, observou-se um perfil de expressão quantitativa relativa de genes *POD* que foi similar, independente do indutor. Aos 7 DAP, momento da inoculação, os níveis de transcritos induzidos pelo patógeno eram altos e estaticamente iguais em mudas tratadas com Bion® ou com Agro-Mos®. Aos 7,5 e 9 dias, 12 e 48 horas após inoculação, h.a.i., houve queda nos níveis de transcritos induzidos pelo patógeno, tendo a expressão de genes *POD* em mudas tratadas com Bion® sido significativamente maior em comparação às mudas tratadas com Agro-Mos®. No entanto, um novo pico na expressão quantitativa relativa de genes *POD* foi observado aos 11 dias, 96 h.a.i, em mudas tratadas com Bion® e inoculadas com *C. perniciosa*, o que não foi observado em mudas tratadas com Agro-Mos®, nas quais o nível de transcritos aparentemente se manteve mais baixo, desde 7,5 até 11 dias (Figura 5A).

Aos 7 DAP, momento da inoculação, a inoculação com o patógeno levou a níveis de expressão de genes *CHI* estatisticamente mais altos em mudas de cacauero tratadas com Bion® do que naquelas tratadas com Agro-Mos®. Nestas plantas tratadas com Bion®, queda significativa na expressão de genes *CHI* subsequente à inoculação com *C. perniciosa* ocorreu aos 7,5 e 9 DAP, 12-48 h.a.i, tendo, aos 11 dias, 96 h.a.i., sido observado novo aumento no nível de transcritos *CHI*. Por outro lado, nas mudas tratadas com Agro-Mos®, a inoculação com o patógeno levou a um perfil de expressão distinto em relação ao tratamento com Bion®. Um segundo aumento significativo na expressão de genes *CHI* ocorreu aos 9 DAP, 48 h.a.i., tempo anterior ao observado em mudas

tratadas com Bion®, aos 11 DAP, o qual foi seguido de uma queda significativa aos 11 DAP, 96 h.a.i. (Figura 5B).

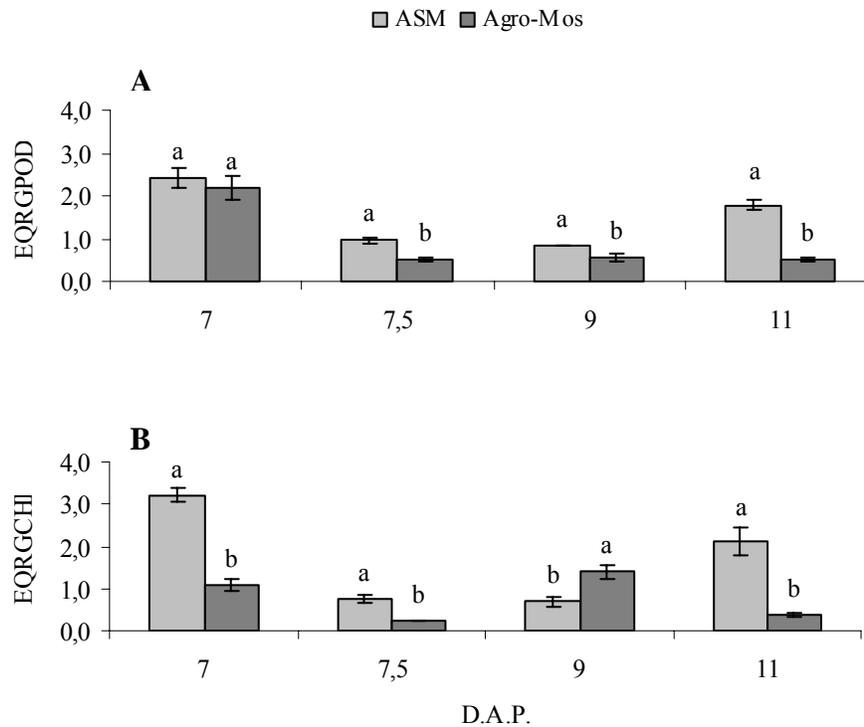


FIGURA 5 - Perfil da expressão quantitativa relativa por real-time PCR (RT-qPCR) dos genes *POD* (A) e *CHI* (B), aos 7, 7,5, 9, 11 dias após pulverização com Bion® e Agro-Mos®, equivalentes a 0, 0,5, 2, 4 dias após inoculação com *C.perniciosa*. Colunas representam a indução média de transcritos gênicos em plantas induzidas e inoculadas relativas ao controle (induzidos e não inoculados), no mesmo período, com valores dados a partir de “pool” de RNA de réplicas biológicas. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão de genes *actina*. Médias com a mesma letra por tempo de avaliação não diferem entre si, pelo Teste *t* - Student, a 5% de probabilidade. EQRGPOD (expressão quantitativa relativa de genes *POD*), EQRGCHI

(expressão quantitativa relativa de genes *CHI*), DAP (dias após pulverização). A inoculação ocorreu aos 7 DAP.

4.3 Alterações no perfil de expressão quantitativa relativa dos genes *POD* e *CHI* em cacaueteiro, causadas pelo efeito aditivo de indutor e inoculação com *Crinipellis perniciosa*

Analisando o efeito do patógeno sobre a expressão gênica quantitativa em mudas controle, pulverizadas com água, inoculadas com *C. perniciosa*, foi possível observar que os níveis de expressão de genes *POD* se mantiveram constantes ao longo do período avaliado (Figuras 6A e 6B). O mesmo não foi observado para a expressão de genes *CHI*, para os quais maior nível foi detectado aos 7 DAP, momento da inoculação, seguido por decréscimo gradativo até os 11 DAP, 96 h.a.i., tempo em que o nível de expressão foi próximo da não detecção (Figuras 6A e 6B).

A análise do efeito aditivo Bion® mais *C. perniciosa* sob a expressão quantitativa relativa dos genes *POD* e *CHI* em mudas de cacaueteiro revelou um pico de expressão para ambos os genes aos 7 DAP, no momento da inoculação, tendo o efeito do patógeno sido maior que o efeito do indutor (Figuras 6C e 6E). Aos 7,5 DAP, 12 horas após inoculação - h.a.i, houve queda significativa nos níveis de transcritos de *POD*, verificando-se apenas o efeito de Bion® e nenhum efeito do patógeno sobre a expressão gênica (Figuras 6C). No entanto, aos 9 DAP, 72 h.a.i, observou-se novo aumento na expressão de genes *POD* devido ao efeito do indutor, bem como uma eventual supressão devido ao patógeno. O efeito do patógeno voltou a contribuir para o aumento da expressão de genes *POD* aos 11 DAP, 96 h.a.i., quando o efeito do indutor foi novamente reduzido. Em relação aos genes *CHI*, houve decréscimo na expressão gênica durante os 7,5 DAP, 12 h.a.i, devido ao efeito do Bion® e supressão em virtude do efeito do patógeno (Figura 6E). Aos 11 DAP, o efeito do indutor na expressão de genes

CHI foi menor e o patógeno contribuiu para pequeno aumento da expressão gênica.

Por outro lado, o efeito aditivo Agro-Mos® mais *C. perniciosa* sob a expressão quantitativa relativa dos genes *POD* e *CHI* em mudas de cacaueteiro revelou um pico de expressão, para ambos os genes, aos 7 DAP, momento da inoculação, observando-se similar efeito de ambos sobre os níveis de transcritos de genes *POD* (Figura 6D), enquanto o efeito do indutor foi maior sobre a expressão de genes *CHI* (Figura 6F). Aos 7,5 DAP, 12 h.a.i, houve decréscimo na expressão de ambos os genes e supressão devido ao patógeno. Na expressão de genes *POD*, demonstrada aos 9-11 DAP, 72-96 h.a.i., não houve efeito devido ao patógeno (Figura 6D). Similar ao que foi observado para o efeito aditivo de Bion®/*C. perniciosa* em relação aos genes *CHI*, houve decréscimo na expressão gênica durante os 7,5 DAP, 12h.a.i, devido ao efeito do Agro-Mos® e supressão devido ao efeito do patógeno (Figura 6F). Aos 9 DAP, 72 h.a.i, observou-se redução na expressão devido ao efeito do indutor e discreta indução devido ao efeito do patógeno (Figura 6F). Os níveis de expressão de genes *CHI* detectados aos 11 DAP, 96 h.a.i., foram os mais baixos observados, com pequeno efeito devido ao Agro-Mos® e início da supressão gênica devido ao efeito do patógeno (Figura 6F).

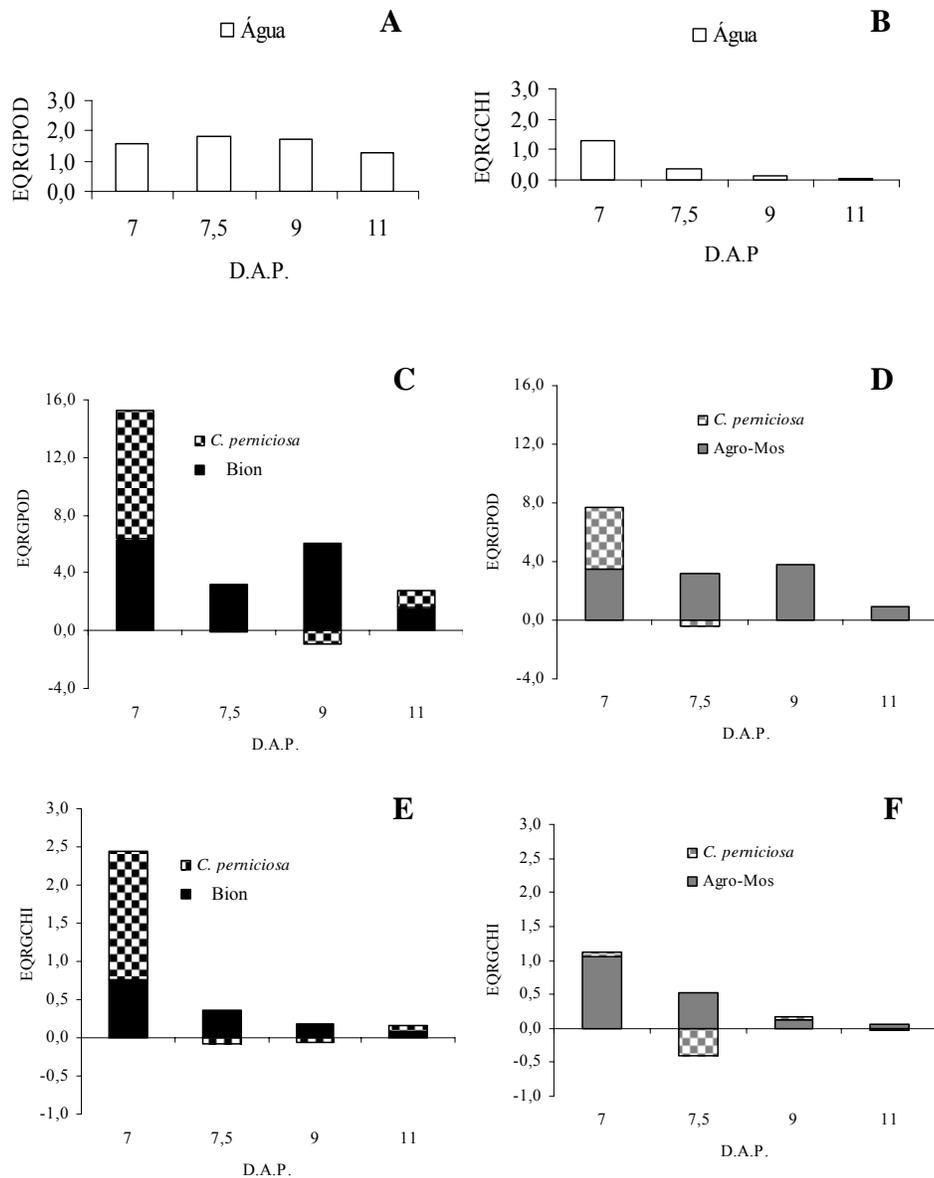


FIGURA 6 - Perfil da expressão quantitativa relativa por real-time PCR (RT-qPCR) dos genes *POD* (A, C e D) e *CHI* (B, E e F) aos 7, 7,5, 9, 11 dias após indução por Bion® (Bion®) e Agro-Mos®, equivalentes a 0, 0,5, 2, 4 dias após inoculação com *C. pernicioso*. Colunas representam a

indução média de transcritos gênicos em plantas induzidas e inoculadas relativas aos controles não induzidos e não inoculados, no mesmo período, com valores dados a partir de “pool” de RNA de réplicas biológicas. A abundância de transcritos gênicos foi normalizada pela expressão de genes *actina*. EQRGPOD (expressão quantitativa relativa de genes *POD*), EQRGCHI (expressão quantitativa relativa de genes *CHI*). DAP: dias após pulverização. A inoculação ocorreu aos 7 DAP.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi investigada, pela primeira vez, a expressão quantitativa relativa de genes *POD* e *CHI* em mudas de genótipo suscetível de *T. cacao* em resposta aos indutores de resistência Bion® e Agro-Mos® e inoculação com *C. pernicioso*. A indução de genes relacionados com a defesa representa um dos melhores marcadores para estudar a ativação de defesa mediada por eliciadores na interação planta-patógeno. Neste contexto, os genes *POD* e *CHI* foram escolhidos devido a relatos anteriores de que as proteínas por eles codificadas são acumuladas, em cacaueteiro (Costa, 2008) e em outras plantas (Baysal et al., 2003, Cavalcanti et al., 2006a, Cavalcanti et al., 2006b, Pereira et al., 2008), em resposta a patógenos e a indutores de resistência.

5.1. Genes *POD* e *CHI* são ativados em cacaueteiro após indução por Bion® e Agro-Mos®

A detecção de níveis de expressão mais elevados de genes *POD* em três pontos distintos, 2, 7 e 9 DAP, após a indução por Bion®, e apenas em dois pontos, 2 e 7,5-9 DAP, após indução por Agro-Mos®, revela diferenças na indução, conduzindo a diferentes padrões de expressão desses genes. A observada presença de mais de um pico de expressão em distintos tempos pode significar a síntese *de novo* desses genes, com provável amplificação do sinal, comumente relatada em respostas de resistência.

Os níveis detectados de transcritos de genes *CHI* em mudas de cacaueteiro tratadas com Bion® e Agro-Mos® foram mais baixos do que aqueles detectados para genes *POD*. O efeito dos indutores na ativação de genes de defesa depende do gene que está sendo monitorado. Peroxidase já foi citada como uma das classes de genes que respondem diretamente a indutores de resistência (Thulke & Conrath, 1998; Katz et al., 1998; Conrath et., 2002). No caso de genes *CHI*, já

foi demonstrado que a expressão constitutiva desses genes em folhas jovens de cacaueteiro ocorre em níveis baixos (Bailey et al., 2005). Por isso, os níveis detectados neste trabalho foram significativamente induzidos, apesar de terem sido inferiores àqueles encontrados para genes *POD*.

Ainda para genes *CHI*, no padrão de expressão foi revelado apenas um pico máximo de indução detectável, tendo a expressão máxima induzida por Bion® ocorrido mais precocemente, aos 0,5 DAP, enquanto que a indução por Agro-Mos® ocorreu entre 2-4 DAP. Além disso, embora a indução de genes *CHI* por Bion® tenha ocorrido mais rapidamente (0,5 DAP) do que por Agro-Mos® (2-4 DAP), os níveis de expressão eliciados pelo Agro-Mos® se mantiveram mais altos e em maior tempo do que aqueles eliciados por Bion®. Adicionando-se a estas evidências a observação de que transcritos de *POD* também se mantiveram em níveis mais elevados e por mais tempo, como indicado durante o segundo pico de expressão, aos 7,-9 DAP, pode-se especular que os diferentes sinais, ASM para Bion® e manano-oligossacarídeo fosforilado de parede celular de *S. cerevisiae* para Agro-Mos®, estejam eliciando diferentes vias de sinalização de defesa.

Em estudos recentes tem sido relatada a existência de uma nova cascata de sinalização em plantas, induzida por oligossacarídeos, ainda não bem caracterizada, na qual genes relacionados à defesa são induzidos (Potin et al., 1999). Por outro lado, a via de sinalização do ácido salicílico, do qual ASM é análogo, já esta bem estudada.

5.2. Expressão de genes *POD* e *CHI* em cacaueteiro induzido por Bion® e Agro-Mos® é potencializada pela inoculação com *Crinipellis pernicioso*

O efeito do patógeno em mudas de cacaueteiro tratadas com Bion® e Agro-Mos® foi observado como picos de expressão dos genes *POD* e *CHI* em resposta aos dois indutores no momento da inoculação (7 DAP). Os vários

fenômenos de resistência induzida estão associados a uma aumentada capacidade para uma rápida e efetiva ativação de respostas de defesa celular, a qual é induzida apenas após o contato com o patógeno desafiador, processo este chamado “*priming*” (Conrath et al., 2002).

A possibilidade de a aumentada e imediata expressão dos genes *POD* e *CHI* em resposta a *C. pernicioso*, revelada em cacauero exibindo resistência induzida, fazer parte do processo *priming* precisa ser melhor investigada. Para tanto, a expressão de genes *NPRI*, considerado o regulador chave da resistência induzida e das respostas de *priming*, poderia ser quantitativamente analisada nas mesmas amostras de cDNA estudadas. Este estudo torna-se importante uma vez que o efeito *priming* pode estar relacionado com a economia de energia da planta na ativação das respostas de defesa, que ocorre somente na presença do patógeno.

Entretanto, a expressão gênica potencializada pelo patógeno em mudas de cacauero com possível efeito *priming* revelou ser diferente entre: 1) os indutores, 2) os genes expressos e 3) entre o perfil de expressão ao longo do tempo. A diferença entre os indutores foi claramente mostrada para genes *CHI*, em que a expressão desses genes no tempo 7 DAP, em plantas tratadas com Agro-Mos®, foi inferior e significativamente diferente daquelas tratadas com Bion®, ao contrário do que foi observado para genes *POD*, em que altos níveis foram encontrados no mesmo tempo. O perfil de expressão de ambos os genes foi interessantemente similar em plantas tratadas com Bion® e diferente em plantas tratadas com Agro-Mos®. A presença de um segundo pico de expressão dos genes, observado para *CHI* aos 9 DAP (48 horas após a inoculação do patógeno, h.a.i.) em plantas tratadas com Agro-Mos® e para ambos os genes aos 11 DAP (72 h.a.i.), em plantas desafiadas com *C. pernicioso*, indica uma provável síntese *de novo* desses genes em resposta ao patógeno e, ainda, que

diferentes vias de resposta de defesa devem estar envolvidas nas respostas aos indutores estudados.

5.3 Mudanças de cacaueteiro suscetível responde à presença do patógeno ativando genes *POD* e *CHI* e efeito aditivo na expressão é evidente na presença de indutores e patógeno

Para estudar o efeito aditivo da expressão dos genes, compararam-se mudas tratadas com os indutores Bion® ou Agro-Mos®/inoculadas com o patógeno contra mudas controle/não inoculadas. Como critério, o efeito do patógeno em mudas controle (pulverizadas com água)/inoculadas com *C. pernicioso*) também foi comparado com mudas controle/não inoculadas. Interessantemente, o genótipo suscetível de cacaueteiro cv. Catongo responde à presença do patógeno, uma vez que aumentos nos níveis de expressão dos genes *POD* e *CHI* foram nitidamente observados em mudas de cacaueteiro controle/inoculadas com o patógeno. Como paradigma, respostas eliciadas por patógenos em genótipos suscetíveis ocorrem em menor intensidade e mais lentamente do que aquelas evocadas em genótipos resistentes, e isto já foi demonstrado entre genótipos de cacaueteiro (Leal Júnior et al., 2007).

Comparando o perfil de expressão entre os genes analisados ainda nas mudas controle (pulverizadas com água)/inoculadas com *C. pernicioso*, níveis baixos da expressão de genes *POD* se mantiveram similarmente ao longo do tempo estudado, enquanto que níveis de genes *CHI* foram gradativamente reduzidos, chegando a níveis próximos dos não detectáveis aos 11 DAP. Aparentemente, os níveis de genes *CHI* foram silenciados na presença do patógeno. Supressão de defesa por patógenos em genótipos suscetíveis de plantas hospedeiras vem sendo amplamente estudada como uma das etapas chaves na patogênese (Nomura et al., 2005). A demonstração de que genes *CHI*

não são induzidos por patógeno já foi realizada em cacaueteiro contra *C. pernicioso* (Leal Júnior et al., 2007).

De modo geral, o efeito aditivo sobre a expressão de ambos os genes em mudas tratadas com os indutores Bion® ou Agro-Mos®/inoculadas com o patógeno foi observado somente aos 7 DAP, exceto em mudas tratadas com Bion® aos 11 DAP em que este efeito também foi observado. Nos demais tempos analisados, observou-se que os níveis de expressão aumentada dos dois genes nas plantas foram devido ao efeito dos indutores, enquanto que o efeito do patógeno foi mais pronunciado para a supressão de defesa.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral, a resposta de plantas a indutores e a patógenos pode ser visualizada pela expressão gênica, característica de cada gene. Com base nos resultados, neste trabalho, foi relatada a demonstração de que genes do tipo *POD* e *CHI* foram induzidos em cacauero pelo tratamento com ambos os indutores de resistência, Bion® e Agro-Mos®, porém, levando a perfis de expressão bastante distintos. A expressão gênica induzida por Bion® ocorreu mais rapidamente do que aquela induzida por Agro-Mos®. Se a resistência mediada pelos indutores, verificada pela expressão desses genes, confere redução na severidade dos sintomas da doença causada por *C. perniciosa* em cacauero, não foi aqui demonstrada, uma vez que os primeiros sintomas aparecem cerca de 30 dias após inoculação, tempo este inadequado para análise da expressão gênica. Entretanto, o efeito do tratamento com indutores sobre a incidência de vassoura-de-bruxa em cacauero já foi descrito por Costa (2008), nas mesmas condições estudadas neste trabalho. Por analogia, pode-se considerar que a detecção e a quantificação da expressão desses genes de defesa devem estar relacionadas à existência de cascatas de resistência ativadas em cacauero, as quais contribuem para a redução dos sintomas da doença e que, aparentemente, peroxidases estão mais envolvidas do que quitinases.

Por fim, a determinação de uma dose apropriada no tempo apropriado de pré-indução com o oligossacarídeo apropriado ou com ASM pode levar a uma resistência sistêmica eficiente e duradoura contra a infecção por patógenos. Neste contexto, a sistemática investigação da expressão de genes de defesa em cacauero na presença e na ausência de sinais de oligossacarídeos ou ASM deve contribuir para decifrar a natureza e as vias de transdução de sinais de defesa induzidas por eles, com potencial efeito *priming* sobre infecção por patógenos. Com base nos resultados apresentados, ficou claro o potencial do Agro-Mos®

em estimular genes de defesa, provavelmente numa cascata não específica e ainda não bem caracterizada, que deve ser diferente daquela induzida por Bion®, contribuindo com a caracterização e a validação do potencial do produto para aplicações práticas.

7 CONCLUSÕES

Como base nos resultados, é possível concluir que:

1 - os genes do tipo *POD* e *CHI* foram induzidos em cacauero pelo tratamento com os indutores de resistência Bion® ou Agro-Mos®, com perfis de expressão bastante distintos;

2 - a expressão gênica induzida por Bion® ocorre mais rapidamente do que aquela induzida por Agro-Mos®;

3 - a expressão dos genes foi potencializada pelo patógeno em mudas de cacauero induzidas, sendo diferente entre os indutores, entre os genes expressos e entre o perfil de expressão ao longo do tempo;

4 - o genótipo suscetível de cacauero cv. Catongo não induzido responde à presença do patógeno com aumentos nos níveis de expressão dos genes *POD* e *CHI*;

5- efeito aditivo do indutor mais *C. pernicioso* sobre a expressão de ambos os genes foi observado somente no momento da inoculação com o patógeno.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEMANNI, L.; DEVIC, M.; NIEMENAK, N.; SANIER, C.; GUILLEMINOT, J.; RIO, R.; VERDEIL, J. L.; MONTORO, P. Characterization of leafy cotyledon1-like during embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Planta**, Berlin, v. 227, n. 4, p. 853-866, Mar. 2007.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, n. 25, n. 17, p. 3389-3402, Sept. 1997.

ATHAYDE SOBRINHO, C.; FERREIRA, P. T. O.; CAVALCANTI, L. S. C. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Eds.). **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 51-80.

BAILEY, B. A.; STREM, M. D.; BAE, H.; MAYOLO, G. A.; GUILTINAN, M. J. Gene expression in leaves of *Theobroma cacao* in response to mechanical wounding, ethylene and/or methyl jasmonate. **Plant Science**, Clare, v. 168, n. 5, p. 1247-1258, May 2005.

BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 441-443, set. 1997.

BAYSAL, O.; SOYLU, E. M.; SOYLU, S. Induction of Defense-related Enzymes and Resistance by the Plant Activator Acibenzolar-S-Methyl in Tomato Seedlings Against Bacterial Canker Caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *Michiganensis*. **Plant Pathology**, v. 52, n. 6, p. 747-753, Dec. 2003.

BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R. Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Plant Journal**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 13-21, 1998a.

BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R. R. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicislycopersici* in tomato. **Plant Physiology**, v. 118, n. 4, p. 1203–1212, Dec. 1998b.

BOWERS, J. H.; BAILEY, B. A.; HEBBAR, P. K.; SANOGO, S.; LUMSDEN R. D. The impact of plant diseases on world chocolate production, **Plant Health Progress**, St. Paul, 2001. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/online/feature/cacao>>.

BRITO, D. S. **Análise Funcional do Gene da Glicanase Isolado de uma Biblioteca de cDNA da Interação entre *Theobroma cacao* e *Crinipellis perniciosa***. Ilhéus: UESC, 2005. 66 p.

CAMPOS, M. A.; MONTE, D. C.; GROSSI DE SÁ, M. F. Mecanismos Moleculares Responsáveis pela Resistência em Interações Planta-Patógeno do Tipo Gene a Gene. **Universa**, Brasília, V.8, n. 1, p. 275-304, 2000.

CAMPOS, M. A.; GROSSI DE SÁ, M. F. Resistência Mediada Pela Expressão de Proteínas e Peptídeos Antimicrobianos. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS: APLICAÇÕES NO MANEJO INTEGRADO DE FITODOENÇAS, 1., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2002. p. 127-155.

CONRATH N.; PIESTERSE, C. M. J.; MANI, B. M.; Priming in plant-pathogens interaction, **Plant Science**, v. 7, n. 5, p. 210-216, 2002.

CARDOSO FILHO, J. A. C. **Efeito de extratos de Albebo de Laranja (*Citrus sinensis*) dos Indutores de Resistência Ácido Salicílico, Acibenzolar-S-Metil, *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (Teleomorfo: *Guignardia citricarpa*)**. 2003. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; LIMA, J. P. M. S.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVIERA, J. T. A. O. Activities of oxidant enzymes and photosynthetic response in tomato pré-treated by plant activators and inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, n. 4-6, p. 198-208, Apr./Jun. 2006a.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; PEREIRA, R. B.; COSTA, J. C. B.; CARVALHO, C. P. S. Atividades de quitinase e beta-1,3-glicanase após

elicitação das defesas do tomateiro contra murcha bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1721-1730, 2006b.

CAVALCANTI, L. S.; RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; SANTOS, F. S.; COSTA, J. C. B.; FERREIRA, J. B.; ARAÚJO, D. V.; MUNIZ, M. F. S.; DEUNER, C. C.; MIRANDA, J. C. Ativadores de Resistência Disponíveis Comercialmente. REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS, 2.; SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 2004, Lavras. **Anais..** Lavras: UFLA, 2004. v. 1, p. 83-98.

COSTA, J. C. B. **Prospecção de indutores de resistência para o manejo da vassoura-de-bruxa do cacauero**. 2008. p. 86. Tese (Doutorado em Agronomia /Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L.; VELOSO, J. L. M.; NIELLA, G. R.; BASTOS, C. N. Controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero. In: VERNON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. (Ed.). **Tecnologias alternativas para o controle de pragas e doenças**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2006. p. 25-47.

CUSTERS, J. H. H. V. **Engineering Disease Resistance in Plants**. 2007. 182 p. Thesis (Doctor in Fytopathologie) – Wageningen Universiteit, Wageningen.

DANTAS, S. A. F., OLIVEIRA, S. M. A., BEZERRA NETO, E., COELHO, R. S. B. C.; SILVA, R. L. X. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 314-19, jul./set. 2004.

FERREIRA, L. T. Cacau. **Biotecnologia: ciência e desenvolvimento**, Uberlândia, v. 1, n. 3, p. 20-24, nov./dez. 1997

FERREIRA, R. B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C. N.; CHEN, Z.; BATISTA, L.,M.; DUARTE, J.; BORGES, A.,; TEIXEIRA, A.,R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis Molecular. **Plant Pathology**, Oxford, v. 8, n. 5, p. 677–700, Sept. 2007.

FRIAS, G. A.; PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. An inoculation method for evaluate resistance of cocoa to *Crinipellis pernicioso*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n. 8, p.787-791, Aug. 1995.

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F.; MORAES, W. B. C. Induced protection of coffee plants to *Hemileia vastatrix*. I. Partial purification of the extracellular inducer from heat-killed urediniospores of the pathogen. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 4, p. 377-385, dez. 1987

GUZZO, S. D. **Aspectos Bioquímicos e Moleculares da Resistência Sistêmica Adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. 2004. 236 p. Tese (Doutorado em Engenharia) – Centro de Engenharia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

GUZZO, S. D.; HARAKAVA, R.; TSAI, S. M.; Expressão de Genes Associados à Resistência Sistêmica Adquirida. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS, 2., SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004. p. 60-70.

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, M. J.-P.; VAN LOON, L. C. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 1–6, Jan. 2001.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G.; Responses to Plants Pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American society of Plant Physiologists, 2000. p. 1102-1155.

JOHNSTON, T.; REIS, R. F.; TIMMER, L. W. Evaluation of Products for Control of Alternaria Brown Spot on Murcott Tangor. **Boletim Técnico**, Jaguariuna, 2005. 3 p.

KATZ, V. A.; THULKE, O. U.; CONRATH, U. A benzothiadiazole primers parsley cells for augmented elicitation of defense responses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, n. 4, p. 1333-1339, Aug. 1998.

KUCHITSU, K.; KIKUYAMA, M.; SHIBUYA, N. N-acetyl acetylchitoooligosaccharides, biotic, elicitor for phytoalexin production induce transient membrane depolarization in suspension-cultured rice cells. **Protoplasts**, Vienna, v. 174, n. 1-2, p. 79-81, 1993.

LAGRIMINI, L.M.; VAUGHN, J.; ERB, W.A.; MILLER, S. A. Peroxidase overproduction in tomato - wound-induced polyphenol deposition and disease resistance. **Hortscience**, Alexandria, v. 28, n. 3, p. 218-221, Mar. 1993.

LAMB, C.; LAWTON, M. A.; DRON, M.; DIXON, R. A. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. **Cell**, Cambridge, v. 56, n. 4, p. 215-224, Nov. 1989.

LEAL JÚNIOR, G. A.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; FIGUEIRA, A. Genes Differentially Expressed in *Theobroma cacao* Associated with Resistance to Witches' broom Disease caused by *Crinipellis pernicioso*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 279-292, May 2007.

LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.; LAMB, C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, Cambridge, v. 79, n. 4, p. 583-93, Nov. 1994.

LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L.; RESENDE, M. L. V.; OLIVEIRA, M. L. Doenças do cacauzeiro. In: RIBEIRO DO VALE; F. X.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas**. Brasília: MAA, 1997. p. 611-656.

LYON, G. D.; NEWTON, A. C. Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 636-641, Oct. 1997.

MAXEMIUC-NACCACHE, V.; DIETRICH, S. M. C. Changes in phenols and oxidative enzymes in resistant and susceptible *Coffea arabica* inoculated with *Hemileia vastatrix* (coffee rust). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 185-190, dez. 1985.

MAXIMOVA, S. N.; MARELLI, J. P.; YOUNG, A.; PISHAK, S.; VERICA, J. A.; GUILTINAN, M. J. Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. **Planta**, Berlin, v. 224, n. 4, p. 740-749, Sept. 2006.

MESQUITA, L. X., SALES-JÚNIOR, R., NASCIMENTO, M. T., CORREIA, K. C., FREITAS, L. S.; FERREIRA, H. A.. Efeito de diferentes elicitores no controle do oídio do meloeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 103, ago. 2005. Suplemento.

MORAES, M. G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 261-84, 1998.

MOTILAL, L. A.; SIRJU-CHARRAN, G.; SREENIVASAN, T. N.; Effect of *Crinipellis pernicioso* Infection on Abscission of Cacao Cotyledone, Reserve Mobilization and Dry Matter Partitioning. **Jornaul Phytopathology**, Berlin, v. 151, n. 10, p. 546-552, Oct. 2003.

NING, W.; CHEN, F.; MAO, B.; LI, Q.; LIU, Z.; GUO, Z.; HE, Z. N-acetylchitoooligosaccharides elict rice defense responses including hypersensitive response-like cell death, oxidative burst and defense gene expression. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 64, n. 5, p. 263-271, May 2004.

NISHIZAWA, Y.; KAWAKAMI, H. J.; HE, D. Y.; SHIBUYA, N.; MINANI, E. Regulation of chitinase gene expression in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitoooligosaccharides: differences in the signal transduction pathways leading to the activation of elicitors-responsive genes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 39, n. 5, p. 907-914, Mar. 1999.

NOJOSA, G. B. A.; RESENDE, M. L. V.; RESENDE, A.V. Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ. 2005. p. 139-153.

NOJIRI, H.; SUGIMORI, M.; YAMANE H.; NISHIMURA, Y.; YAMADA, A.; SHIBUYA N. Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured rice cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 110, n. 2, p. 387-92, Feb. 1996.

NOMURA, K.; NELOTO, M.; HE, S.Y. Suppression on host defense in compatible plant – *Pseudomonas syringae* interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, n. 4, p. 361-368, Aug. 2005.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 1-51, 1994

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, p. 417-53, 1995

PENG, M.; KUC, J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro on tobacco leaf discs. **Physiology and Biochemistry**, St. Paul, v. 6, n. 82, p. 696-699, 1992.

PEREIRA, R. B.; RESENDE, M. L. V.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; LUCAS, G. C.; CAVALCANTI, F. R. Ativação de Defesa em Cacaueiro contra Murcha-da-verticílio por Extratos Naturais e Acibenzolar-S-Metil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 2, p. 171-178, fev. 2008.

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

POTIN, P.; BOUARAD, K.; KUPPER, F.; KLOAREG, B. Oligosaccharide recognition signals and defense reactions in marine plant-microbe interactions. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, n. 3, p. 279-283, June 1999.

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

RAMONELL, K.; BARROCAL-LOBO, M.; KOH, S.; WAN, J.; EDWARDS, H.; STACEY, G.; SOMERVILLE, S. Loss-of-function mutations in chitin responsive genes show increased susceptibility to the powdery mildew pathogen *Erysiphe cichoracearum*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 38, n. 2, p. 1027-1036, June 2005.

RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; AGUILAR, M. A. G.; SILVA, L. H. C. P.; NIELLA, G. R.; CARVALHO, G. A.; GIOVANINI, G. R.; CASTRO, R. M. Perspectivas da indução de resistência em cacaueiro contra *Crinipellis pernicioso* através do benzoatiazole (BHT). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n.2, p. 149-156, jun. 2000.

RESENDE, M. L. V.; BARRETI, P. B.; DIAS, W. P. Percepção, transdução e tradução de sinais para respostas de defesa contra patógenos em plantas. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS: APLICAÇÕES NO MANEJO INTEGRADO DE FITODOENÇAS, 1., 2002, Lavras. **Palestras Expandidas...** Lavras: UFLA, 2002a. p. 9-35.

RESENDE, M. L. V.; NOJOSA, G. B. A.; CAVALCANTI, L. S.; AGUILAR, M. A. G.; SILVA, L. H. C. P.; PEREZ, J. O.; ANDRADE, G. C. G.; CARVALHO, G. A.; CASTRO, R. M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by Acibenzolar S-Methyl (ASM). **Plant Pathology**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 621-628, Oct. 2002b.

RESENDE, M. L. V.; ARAUJO, D. V.; COSTA, J. C. B.; DEUNER, C. C.; FERREIRA, J. B.; MUNIZ, M. F. S.; REIS, S. N.; SANTOS, F. S.; CAVALCANTI, L. S.; NOJOSA, G. B. A. Produtos comerciais a base de bioindutores de resistência em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 14, p. 361- 380, 2006

RESENDE, M. L. V.; BARRETTI, P. B.; MEDEIROS, F.C. L.; SILVA, D. D.; PEREIRA, R. B.; LINS, S. R. O.; PEREIRA, L. M.; CAMPOS, M. A. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 15, p.129-198, 2007.

RYALS, J. A.; NEUENSCSHWANDER, U.H.; WILLITS, M.G.; MOLINA, A.; STEINER, H. Y.; HUNT, M. D. Systemic Acquired Resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 10, p. 1809-1819, Oct. 1996.

TSUKADA, K.; ISHIZAKA, M.; FUJISAWA, Y.; IWASAKI, Y.; YAMAGUCHI, T.; MINANI, E.; Rice receptor for chitin oligosaccharide elicitor does not couple to heterotrimeric G-protein:elicitor responses of suspension cultured rice cells from Diakoku Darf (dI) mutants lacking a functional G-protein α -subunit. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 116, n. 3, p. 373-382, Nov. 2002.

THULKE, O. U.; CONRATH, U. Salicylic acid has a dual role in activation of defense-related genes in parsley. **Plant Journal**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 35-42, Apr. 1998.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologia Plantarum**, Warsaw, v. 13, n. 1, p. 43-50, 1991.

VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 9, p. 753-765, Dec. 1997.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review Phytopathology**, Pal Alto, v. 36, p.453-483, 1998.

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

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 135-62, 2006.

VANDER, P.; VARUM, K. M.; DOMARD, A.; EDDINE, A.; GUEDDARI, N.; MOERSH BACHER, B. M. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitoooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, n. 4, p. 1353-1359, Dec. 1998.

VERICA JA, MAXIMOVA SN, STREM MD, CARLSON JE, BAILEY BA, GUILTINAN MJ. Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. **Plant Cell Reports**, New York, v. 23, n. 6, p. 404-413, Nov. 2004.

VIDHYASEKARAN, P. Lignin and disease resistance. In: VIDHYASEKARAN, P. (Ed.). **Physiology of Disease Resistance in Plants**. Boca Raton, CRC, 1988. v. 2, p. 121-135.

VIEIRA, D. R.; VALLE, R. R.; LIMA, A. A.; Indução de Resistência Sistêmica para o Controle da Vassoura-de-Bruxa em Cacaueiros Adultos do Clone ICS 1. CEPLAC. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS, 2.; SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004. p. 103.

WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Cocoa**. 4th ed. Oxford: Blackwell Science, 2001. 620 p.

WU, G.; SHORTT, B.; LAWRENCE, E.; LEVINE, E.; FITZSIMMONS, K.; SHAH, D. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H O -generating glucose oxidase in transgenic potato plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 9, p. 1357-1368, 1995.

