

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



**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO FILOPLANO DO *Theobroma cacao* L**

**DAYANNE SILVA MONTEIRO DE ALMEIDA**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Fevereiro de 2012**

**DAYANNE SILVA MONTEIRO DE ALMEIDA**

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO FILOPLANO DO *Theobroma cacao* L**

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

**Área de concentração:** Bioquímica e Proteômica

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Fevereiro de 2012**

DAYANNE SILVA MONTEIRO DE ALMEIDA

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO FILOPLANO DO *Theobroma cacao* L

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

**Área de concentração:** Bioquímica e Proteômica.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2012

Dra. Karina Peres Gramacho  
(CEPLAC / UESC)

Dr. Jean-Philippe Marelli  
(MARS)

Prof<sup>a</sup> Dra. Acássia Pires  
(UESC)

Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani  
(Orientador- UESC)

A447 Almeida, Dayanne Silva Monteiro de

Identificação de proteínas do filopiano do  
Theobromacacao L / Dayanne Silva Monteiro de Almeida. –  
Ilhéus, BA: UESC, 2012.

xvi, 77 f.: il.

Orientador: Carlos Priminho Pirovani.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de  
Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e  
Biologia Molecular.

Inclui referências.

1. Cacaueiro – Doenças e pragas – Bahia. 2. Vassoura-de-Bruxa  
(Fitopatologia) – Bahia. 3. Análise foliar. 4. Genética vegetal. 5.  
Bioinformática. I. Título.

CDD 633.74098142

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

(Augusto Jorge Cury)

Aos meus pais, Christovaldo e Cosmélia,  
ao meu filho Enzo Monteiro, e ao meu irmão  
Danillo, pessoas mais importantes na minha  
vida, por todo amor, apoio e confiança.

À Thyago Hermylly, meu amigo-irmão,  
pelo incentivo, pela força, preocupação,  
paciência e por acreditar em mim.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por existir, pelas bênçãos recebidas e por me dar forças nas horas de dificuldade nessa caminhada da vida.

Aos meus pais, por me ensinarem o valor da vida e a vivê-la com dignidade, por todo amor, afeto, dedicação, e por muitas vezes abrirem mão dos seus sonhos para sonharem os meus.

Ao meu filhinho Enzo, por me fazer tão feliz, realizada, por ser minha fonte de inspiração, garra, força de vontade, e com um simples sorriso seu me fazer esquecer os momentos difíceis.

A todos da minha família que torceram, vibraram e me apoiaram nas conquistas e graças alcançadas.

Ao meu orientador Carlos Priminho Pirovani, pela oportunidade de realização do curso, orientação, dedicação, preocupação, presteza, pelos ensinamentos e pelos conselhos muitas vezes dados, que contribuíram muito para minha formação profissional e pessoal.

Às minhas co-orientadoras Fabienne Micheli e Fátima Alvim, pela disponibilidade e contribuição com o meu trabalho.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e à coordenação do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, pelas condições de trabalho proporcionadas.

Ao CNPQ e FAPESB, pela concessão da bolsa e financiamento do projeto, proporcionando desenvolvimento científico e tecnológico ao Brasil.

À pesquisadora Karina Peres Gramacho, pela disponibilidade, viabilização do material biológico e pela contribuição de seu conhecimento para meu trabalho.

Ao Doutor Cristiano Villela Dias, por contribuir com a melhoria e o reconhecimento desse trabalho.

À família Proteômica, pela amizade, pelas discussões de artigos realizadas em nossas reuniões, que contribuíram para meu conhecimento científico e, pelos momentos de carinho mútuo e respeito.

Ao meu amigo e colega Thyago Hermylly, pela amizade verdadeira, pela dedicação, ajuda, paciência, pelo imenso incentivo nas diversas fases da minha vida, pela presença em momentos alegres e tristes, por me encorajar nas horas de insegurança e por simplesmente fazer parte da minha vida.

À minha amiga Dani Koop, pela sua amizade, confiança, por participar das horas alegres e também das horas de sufoco, sempre disposta a me ajudar nos momentos em que precisei.

À Doutora e amiga Amanda Mendes, pela sua preocupação, força, carinho e por me acalmar muitas vezes com um simples abraço apertado ao sentir a minha aflição.

Às amigas doutorandas Laís e Ângela por terem contribuído no desenvolvimento do meu trabalho, passando seus ensinamentos com muita paciência e dedicação. E também a Fabi, Lu Cidade, Sara e Lu Camillo que colaboraram para o meu aprendizado.

Aos alunos de iniciação científica Everton, Rodrigo e, principalmente, Verônica que em algum momento, mesmo não participando diretamente deste projeto me apoiaram nos experimentos.

Aos colegas do laboratório do Fitomol da CEPLAC / CEPEC / SEFIT, Francisca e Louise, que me ajudaram nos experimentos de inoculação. E também a Nara, João e aos trabalhadores da casa-de-vegetação, por auxiliarem nos experimentos realizados.

A todos os amigos e amigas que de alguma forma trouxeram alegria e apoio aos meus dias como Gileno, Sanderson, Joise, Ricardo, Juliana, Emanuelle, Lívia, Allan, Ana Camila, Gleison, Sânzio, Katiuscia, entre tantos outros.

Ao meu namorado Diego Moraes, por existir em minha vida, pelo seu amor, carinho, respeito, compreensão, companheirismo, por abdicar inúmeras vezes seu lazer nos fins de semana para ficar comigo em casa estudando. Enfim, por estar sempre comigo compartilhando tantos momentos bons e por enxugar minhas lágrimas nos dias difíceis.



## ÍNDICE

EXTRATO.....	ix
ABSTRACT .....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xv
LISTA DE TABELAS .....	xvii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Histórico e importância do cacau .....	4
2.2 Importância econômica do cacau.....	5
2.3 <i>Moniliophthora perniciosa</i> .....	7
2.4 Mecanismos de defesa da planta.....	10
2.4.1 Defesa no filopiano das folhas .....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Mineração do gene de filoplanina .....	17
3.2 Análise do gene <i>TcPhyl</i> .....	17
3.3 Clonagem.....	18
3.3.1 Desenho de primers e preparo do fragmento de DNA e vetor de expressão... 18	
3.3.2 Transformação de células de <i>E. coli</i> .....	22
3.4 Expressão da proteína recombinante filoplanina.....	23
3.4.1 Preparo do inóculo e indução da expressão com IPTG .....	23
3.4.2 Extração de proteína por lise celular .....	24
3.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	25
3.5 Material vegetal.....	25
3.5.1 Análises macroscópicas do filopiano .....	26
3.5.2 Extração de proteínas do filopiano .....	26
3.5.3 Dosagem de proteínas .....	27

3.5.4 Gel bidimensional .....	28
3.5.5 Digestão em gel e identificação por MS/MS .....	29
3.6 Inoculação do fungo <i>M. pernicioso</i> .....	30
3.7 Avaliação dos sintomas .....	31
3.8 Análises estatísticas .....	31
4. RESULTADOS .....	32
4.1 Análises do gene que codifica a proteína filoplanina no cacau.....	32
4.1.1 Sequência identificada no CIRAD.....	32
4.1.2 Sequência identificada no banco de sequências genômicas do cacau financiado pela MARS .....	35
4.2 Clonagem.....	38
4.2.1 Amplificação, digestão e purificação do clone TcPhyl.....	38
4.2.2. Digestão e purificação do vetor de expressão pET 28a .....	40
4.2.3 Transformação de <i>E. coli</i> com plasmídeo recombinante .....	40
4.3 Expressão da proteína filoplanina em sistema heterólogo .....	42
4.4 Quantificação da densidade de tricomas glandulares curtos (SGTs) na folha .....	44
4.5 Perfil proteico do filoplano de cacau .....	47
4.5.1 Lavado foliar de Catongo no campo.....	47
4.5.2 Lavado foliar de CCN51 no campo.....	48
4.6 Análise dos sintomas causados pelo <i>M. pernicioso</i> .....	56
4.7 Análises estatísticas da incidência e severidade da doença.....	58
5. DISCUSSÃO .....	60
5.1 Identificação, clonagem e expressão do gene da filoplanina do <i>T. cacao</i> . .....	60
5.2 Identificação de proteínas em gel 1D e 2D.....	62
5.3 Análise da densidade de tricomas e do efeito da irrigação nas folhas quanto à resistência do cacau .....	67
6. CONCLUSÕES .....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70



## EXTRATO

ALMEIDA, Dayanne S, M, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - Bahia fevereiro de 2012. **Identificação de proteínas do filoplano do *Theobroma cacao* L.** Orientador: Dr. Carlos Priminho Pirovani. Co-orientadores: Dra. Fabienne Micheli e Dra. Fátima Alvim Cerqueira.

O sudeste da Bahia é a principal região produtora de cacau (*Theobroma cacao* L.) do Brasil, tem sofrido perdas econômicas devido a diversas doenças que acometem suas plantações, causando perdas de cerca de 30-40% de todo o potencial mundial dessa cultura, destacando-se a vassoura-de-bruxa causada pelo fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*. A disseminação de *M. perniciosa* ocorre via esporos. Esses podem vir a germinar na superfície foliar do cacau, ou filoplano, sendo este um ponto de entrada deste patógeno no hospedeiro. O filoplano é, portanto, um dos primeiros campos de batalha molecular na interação cacau: *M. perniciosa*. O filoplano é formado por tricomas e cutícula e a superfície contém metabólitos, que juntamente com microrganismos, atuam na defesa das plantas contra patógenos. Os tricomas longos (tGSTs) são células especializadas na biossíntese e secreção de metabólitos secundários. Os tricomas curtos (sGSGs) são secretores de proteínas antipatogênicas (filoplaninas). As filoplaninas foram descobertas primeiramente em lavado foliar de tabaco, contudo são também encontradas em diversas outras espécies vegetais. Este trabalho baseou-se na hipótese de que plantas de *T. cacao* poderiam secretar proteínas antipatogênicas para o filoplano. Neste caso, essas proteínas poderiam apresentar um importante papel nos mecanismos iniciais de defesa do cacau contra fitopatógenos, incluindo *M. perniciosa*. Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: (i) Identificar, no genoma do cacau, o gene que codifica para filoplanina; (ii) Clonar o gene, expressar a filoplanina do cacau em bactéria e testar a sua atividade; (iii) Avaliar o índice de pequenos tricomas em superfície foliar de genótipos de cacau contrastantes quanto à resistência a fitopatógenos,

visando estimar se existe relação entre o número de tricomas e a suscetibilidade ou resistência da planta a patógenos; (iv) Identificar as proteínas existentes na superfície foliar do *T. cacao* por meio 2DE-MS/MS; (v) Avaliar o efeito da lavagem foliar (por irrigação) sobre o índice de infecção de dois genótipos contrastantes de cacau quanto à resistência ao fungo *M. perniciosa*. Para isso, foi identificado no banco de EST (**Expressed Sequence Tag Treatment and Investigation Kit- ESTtik**) de cacau do CIRAD ([esttik.cirad.fr](http://esttik.cirad.fr)) uma sequência de DNA homóloga à filoplanina da espécie *Nicotiana tabacum*. Análises de bioinformática identificaram uma ORF de 333 nucleotídeos que codifica uma proteína com 110 aminoácidos (aa), com peso molecular estimado de 11 kDa e pI de 4,43. Utilizando o programa SignalP 3.0 não foi identificado o peptídeo sinal de endereçamento extracelular, o qual seria necessário uma vez que a filoplanina é secretada para o filopiano foliar. Este resultado indicou que a sequência estava incompleta. Esse gene da filoplanina denominado *Tcphyl* foi clonado no vetor pET-28a visando a expressão da proteína em *E. coli*. Contudo, a proteína recombinante não foi detectada nos extratos de *E. coli*. Posteriormente (agosto de 2010), foi disponibilizado o banco de dados genômicos completo do cacau (Cacao Genoma DB- MARS). Neste banco de dados foi identificado um gene com uma ORF de 477 nucleotídeos que codifica uma proteína com 158 aa, de peso molecular estimado de 16 kDa e pI 7,6, sendo identificado em análises no SignalP 3.0 um peptídeo sinal com um sítio de clivagem entre os aa 25 e 26. Esse gene foi também clonado em pET28a visando a expressão da proteína em *E. coli* utilizando a mesma metodologia citada acima. Nesses ensaios realizados não foi possível a produção da proteína recombinante. Análises histológicas de folhas de dois genótipos de *T. cacao*, o CCN51 e o Catongo, resistente e suscetível a *M. perniciosa*, respectivamente, foram realizadas visando obter o índice de ocorrência de SGTs. A variedade CCN51 apresentou uma média de 1600 SGTs.cm<sup>-2</sup> e a variedade Catongo apresentou uma média de 700 SGTs.cm<sup>-2</sup>. Este resultado sugere a existência de uma relação positiva entre o número de SGTs e a resistência do cacau à *M. perniciosa*. O aumento na quantidade de SGTs seria para a planta uma vantagem fisiológica por conferir a mesma a maior capacidade de secretar metabólitos e proteínas para o filopiano, que podem estar envolvidos na defesa da planta. Um total de 600 folhas jovens de cacau da variedade CCN51, isoladas de plantas

estabelecidas no campo, e 1250 folhas de 300 plantas mantidas em casa de vegetação na CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) foram lavadas por 30 segundos de acordo com SHEPHERD (2005). Estes lavados foram filtrados, liofilizados e o extrato proteico separado em SDS-PAGE a 15% e 2D-PAGE a 12,5%. As bandas de gel SDS-PAGE e os spots do gel bidimensional foram excisados do gel, processados e analisados por MS/MS em Micromass ESI-Q-Tof Micro (WATERS). No lavado das folhas do campo foi identificado em uma banda única do gel 1D, uma nova proteína de aproximadamente 35 kDa relacionada à tolerância à seca, provavelmente envolvida na defesa da planta contra estresse abiótico. Entretanto, no lavado foliar de plantas da casa de vegetação (irrigadas somente no solo) foram identificadas 28 proteínas da planta (uma hipotética), predominando proteínas relacionadas à interação planta-patógeno e à síntese e/ou degradação de ácidos nucléicos. Também foram identificadas 13 proteínas de bactérias e 14 spots não foram identificados. A análise de variância do índice de doença nas plantas inoculadas com o fungo foi altamente significativo ( $p < 0,001$ ), tendo uma diminuição de aproximadamente 30% da infecção nas plantas parcialmente molhadas. Os resultados apresentados indicam que o genótipo de cacau CCN51 não acumula filoplanina na folha, mas sustentam a hipótese de que as proteínas e compostos hidrossolúveis secretados para o filoplano devem participar dos mecanismos de defesa contra patógenos. Sugere também que plantas que possuem um maior índice de tricomas em sua fase de desenvolvimento possuem resistência a patógenos por possuírem uma defesa inata.

**Palavras-chaves:** Filoplanina, tricomas, Catongo, CCN51, *Moniliophthora perniciosa*.

## ABSTRACT

ALMEIDA, Dayanne S, M, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-Bahia, february 2012. **Identification of proteins in the phylloplane of the *Theobroma cacao* L.** Advisor: Dr. Carlos Priminho Pirovani. Advisor Committee: Dra. Fabienne Micheli e Dra. Fátima Cerqueira Alvim.

Southern Bahia is the major cacao (*Theobroma cacao* L.) producing region in Brazil. Cocoa plantations worldwide have suffered extensive damage due to various diseases that affects the crop, provoking losses of about 30-40% of all global production. In Bahia, the major cacao pathogen is *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease. Dispersion of *M. perniciosa* happens through spores that can germinate on cacao leaf surface, or phylloplane, that in this case serves as an entry point in the host. Thus, the phylloplane is the first molecular battlefield in this pathosystem. Phylloplane is formed by trichomes, cuticle and surface containing metabolites, which together with microorganisms constitute a known defense of plants against insects and pathogens. The long trichomes (tGSTs) are specialized cells that act in the biosynthesis and secretion of secondary metabolites. The short trichomes (sGSGs) secrete antipathogenic protein known as phylloplanins. This group of proteins were first discovered in tobacco leaf superficies and further on in many other plants. This work is based on the assumption that, as observed on others plants, *T. cacao* phylloplane secrete proteins that present antimicrobial activity. This proteins may have an important role in the early defense mechanisms against pathogens, including *M. perniciosa*. The main objectives of the work were: (i) Identify the gene that codifies to phyloplanin in a cacao genome database, (ii) clone the gene, express the recombinant phylloplanin in bacteria and test its activity; (iii) establish a possible relationship between the number trichomes on cacao leaf surface and the susceptibility/resistance to pathogens. For so the rate of trichomes were

determined on two cacao genotypes: CCN51 and catongo. The first is resistant and the second susceptible to *M. pernicioso*., (iv) Identify proteins present on cacao leaf surface through 2DE-MS/MS, (v) evaluate the effect of leaf washing (by irrigation) on the rate of cacao infection (genotypes CCN51 and catongo) for resistance to fungus *M. pernicioso*. First it was identified in the cacao ESTtik database, obtained by Cirad (**Expressed Sequence Tag Treatment and Investigation Kit- ESTtik**), a DNA sequence that presented homology with tobacco's phyloplanin. A bioinformatic analysis identified an ORF of 333 nucleotides that encoded a protein with 110 amino acids (aa) with estimated molecular weight of 11 kDa and pI of 4.43. The sequence was further analyzed with SignalP 3.0 and no signal peptide related with secretion was identified in the protein sequence. This result suggested that the cDNA was an incomplete sequence of phyloplanin. This phyloplanin gene, called *Tcphyl*, was cloned in a pET-28a vector in order to express the protein in *E. coli*. However, the recombinant protein was not detected in *E.coli* protein extracts. In August, 2010, was released another cacao genome database (Cacao Genome DB-MARS). In this database we identified a sequence of 477 nucleotides that encoded a protein of 158 aa with estimated molecular weight of 16 kDa and pI 7.6. With the use of SignalP3.0 we were able to identify a signal peptide cleavage site between aa 25 and 26. This second gene was also cloned in pet28a in order to express the phyloplanin in *E. coli*, using the same methodology described above. These tests could not be the recombinant protein production. Cacao leaves were analyzed histologically in order to establish the rate of SGTs. In cacao genotype CCN51 the average of SGTs was 1600 SGTs.cm<sup>-2</sup>. In Catongo genotype the average was 700 SGTs.cm<sup>-2</sup>. This result suggested that an improved ability in secreting metabolites to the phylloplane, as expected with a higher SGT content, may act as a plant physiological advantage in the protection against *M. pernicioso*. A total of 600 young leaves, isolated from cocoa field plants genotype CCN51, and 1250 leaves, isolated from 300 cacao plants grown in a greenhouse at CEPLAC, were washed for 30 sec, according to Shepherd (2005). The leaf water washers (LWW) were filtered, lyophilized and the proteins separated by SDS-PAGE 15% and 2-DE gel at 12.5%. The protein bands from the gel SDS-PAGE and spots in the gel 2-DE were



excised, processed and analyzed by MS / MS-ESI Micromass Q-ToF Micro (Waters). With this approach we identified a new 35 KDa protein present in the leaves washed in fields plants. This protein is related to drought tolerance and is probably involved in plant defense against abiotic stress. However, in the leave wash obtained from the greenhouse plants (only in irrigated soil) we identified 28 plant's proteins, mainly proteins related to plant-pathogen interaction and to the synthesis and / or degradation of nucleic acids. It was also identified 13 bacteria's proteins and 24 spots were no hit. Analysis of variance index disease in plants inoculated with the fungus was highly significant ( $p < 0.001$ ), with a decrease of approximately 30% infection in plants partially wet. Together, these results suggest that in cocoa genotype CCN51 phylloplanin does not accumulate in the leaves. Furthermore it support the notion that: a) proteins and water-soluble compounds secreted to phylloplane must attend the defense mechanisms against pathogens; and b) cacao plants that present a higher rate of trichomes in its development phase have tolerance to pathogens.

Keywords: Phylloplanin, trichomes, Catongo, CCN51, *Moniliophthora pernicious*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Plântulas de <i>T. cacao</i> L. mantidas em casa de vegetação .....	5
Figura 2. Ciclo de vida do fungo <i>M. pernicioso</i> (Modificado de Cotomacci, 2004). .....	9
Figura 3. Plasmídeo pET-28a e estratégia de clonagem.. .....	21
Figura 4. Sequência nucleotídica do cDNA da filoplanina do <i>T. cacao</i> identificado no banco de EST's do CIRAD.....	32
Figura 5. Análise do cDNA da filoplanina do cacau.....	33
Figura 6. Resultado do Blastp utilizando a sequência da proteína TcFiloplanina. ....	34
Figura 7. Mapa de restrição apresentado pelo NEBcutter.....	35
Figura 8. Sequência nucleotídica do cDNA da filoplanina identificada na MARS.....	36
Figura 9. Resultado da predição do peptídeo sinal utilizando o programa SignalP 3.0.....	36
Figura 10. Alinhamento do cDNA da filoplanina com a região ainda com a presença do íntron.. .....	37
Figura 11. Mapa físico da estrutura éxon-íntron-éxon do gene <i>TcPhyl</i> . .....	38
Figura 12. Amplificação do fragmento de <i>TcPhyl</i> do CIRAD.....	39
Figura 13. Amplificação e clivagem do <i>TcPhyl</i> da MARS.....	39
Figura 14. Digestão do vetor pET-28a. ....	40
Figura 15. Diagnóstico de transformação em <i>E. coli</i> TOP10 e Rosetta DE3 (CIRAD).....	41
Figura 16. Diagnóstico de transformação em <i>E. coli</i> TOP10 e Rosetta DE3 (MARS).....	42
Figura 17. Indução da proteína filoplanina com adição de IPTG (CIRAD).. .....	43
Figura 18. Indução da proteína filoplanina a 37 °C (MARS).....	44

Figura 19. Identificação de tricomas SGTs em variedades contrastantes de cacau.....	45
Figura 20. Tricomas no ápice caulinar de cacau. Em A, ápice caulinar da variedade suscetível Catongo. ....	45
Figura 21. Quantidade de tricomas glandulares curtos em folhas jovens .....	46
Figura 22. Perfil proteico da lavagem foliar de Catongo no campo.. ....	48
Figura 23. Fracionamento em gel SDS-PAGE 15% de proteínas do lavado foliar de <i>T. cacao</i> L. (CCN51). ....	48
Figura 24. Peptídeos identificados pelo MS/MS, mostrando sequência aminoacídica da proteína identificada no banco de dados genômicos do <i>T. cacao</i> L.....	49
Figura 25. Resultado do Blastp com busca em banco de dados não redundantes do NCBI.....	50
Figura 26. Perfil proteico do lavado foliar da variedade de cacau CCN51. ....	51
Figura 27. Perfil em Gel 2-D de proteínas do lavado foliar do <i>T. cacao</i> .....	53
Figura 28. Distribuição percentual com relação ao organismo de origem das proteínas identificadas por MS/MS a partir de spots de gel 2D do lavado foliar de <i>T. cacao</i> variedade CCN51. ....	55
Figura 29. Plantas de <i>T. cacao</i> infectadas com o fungo da vassoura-de-bruxa. ....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados para amplificação do clone de cDNA obtido do CIRAD. ....	18
Tabela 2. Primers utilizados para amplificação da sequência codificadora da filoplanina do cacau gerada pela MARS. ....	22
Tabela 3. Contagem de tricomas nos meristemas das variedades Catongo e CCN51. ....	46
Tabela 4. Índice de tricomas por cm <sup>2</sup> nas folhas jovens das variedades Catongo e CCN51. ....	47
Tabela 5. Identificação de proteínas por MS/MS do lavado foliar de cacau em gel SDS-PAGE 15%. ....	52
Tabela 6. Lista de proteínas do lavado foliar de cacau, cujos peptídeos gerados por MS/MS apresentaram identidade com proteínas de plantas. ....	54
Tabela 7. Peptídeos do lavado foliar de cacau que apresentaram identidade com proteínas de bactérias. ....	55
Tabela 8. Número de plantas das variedades de cacau Catongo e CCN51 apresentando sintomas da vassoura-de-bruxa após inoculação do fungo <i>M. pernicioso</i> . ....	56
Tabela 9. Porcentagens médias de incidência de vassoura-de-bruxa (SINT) e de agressividade da vassoura-de-bruxa (Vtot) apresentados pelas plântulas de progênies de cacau variedade Catongo e CCN51 submetidas aos tratamentos de irrigação por aspersão (T1) e irrigação somente no solo (T2), seguido de inoculação com <i>M. pernicioso</i> . ....	58

## 1. INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é originário da bacia amazônica, pertencente à família Malvaceae e é uma das culturas tropicais mais importantes. O fruto do cacau é fonte de matéria prima para a bebida de cacau, manteiga e pó para a indústria de chocolate, não apenas por suas propriedades organolépticas, mas também por seus benefícios para a saúde (KRIS-ETHERTON; KEEN, 2002). No entanto, a sua produção é ameaçada por vários patógenos. Dentre eles, o principal na região cacauzeira brasileira é o *Moniliophthora perniciosa* (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005), causador da doença vassoura-de-bruxa, endêmica da região da bacia amazônica (EVANS 1980).

A vassoura-de-bruxa se inicia com a germinação dos esporos liberados pelos basidiósporos na superfície foliar, seguida de penetração no espaço intercelular, estabelecendo uma fase biotrófica da doença (MUSE, 1996). Nessa fase ocorre o surgimento de hipertrofia dos tecidos infectados, perdas de dominância apical e proliferação de brotos axilares que resulta em ramos anormais denominados de “vassouras verdes”. A partir daí o fungo passa a se desenvolver intracelularmente, promovendo o surgimento de tecidos infectados necrosados e posterior morte desses tecidos, causando a “vassoura seca”. Após essa fase e um período de seca acontece a formação dos basidiocarpos nos tecidos necrosados, os quais produzem os esporos, e uma vez liberados infectam cada vez mais plantas, reiniciando assim o ciclo (EVANS, 1980; LAWRENCE; CAMPÊLO; FIGUEIREDO, 1991). O clima da Bahia favorece a produção desses esporos e disseminação da doença durante todo o ano, com períodos intermitentes de seca e umidade (KILARU; HASENSTEIN, 2005).

Os fungos e outros patógenos como os oomycetos, por exemplo, são conhecidos por causarem o maior número de doenças em plantas, resultando em perdas anuais de aproximadamente 20% da cultura mundial (LUCAS, 1998). Com isso, vários estudos têm sido desenvolvidos por instituições de pesquisa com o intuito de compreender melhor os diferentes patossistemas e

suas interações, incluindo cacau-*M. perniciosa* a fim de proporcionar novos métodos de manejo da doença vassoura-de-bruxa.

Sabe-se que o fungo *M. perniciosa*, bem como a maioria dos fungos, se reproduz através de esporos que são dispersos no ar e a superfície da folha, ou filoplano, é o primeiro ponto de contato desses patógenos com a planta. Portanto, as plantas são constantemente expostas a inúmeros microrganismos e não podem escapar desse acúmulo em sua superfície foliar. No entanto, elas utilizam inúmeros mecanismos de defesa para tentar impedir o crescimento de patógenos, incluindo indução (CHISHOLM et al., 2006) ou produção constitutiva de metabólitos secundários (KLIEBENSTEIN; ROWE; DENBY, 2005) e proteínas ou peptídeos (DE LUCCA; CLEVELAND; WEDGE, 2005). Apesar de alguns desses compostos bioquímicos serem provavelmente filtrados do interior da folha (ex. açúcares), outros como os metabólitos secundários são produzidos seletivamente por células especializadas da epiderme: os tricomas – e distribuídos no filoplano, sendo que estes tricomas podem ser simples ou glandulares e encontrados em muitas plantas de diferentes famílias. Alguns estudos demonstram que a densidade de tricomas por unidade de área nas folhas pode ser essencial na questão de suscetibilidade e resistência de uma planta, podendo representar uma resistência natural (DAUB; HAGEDORN, 1979; SHEPHERD; WAGNER, 2007).

Os metabólitos secundários na superfície das folhas são bem documentados e têm sido associados à resistência a insetos e patógenos (WAGNER; WANG; SHEPHERD, 2004). No entanto, a ocorrência e papel de proteínas e peptídeos na defesa inata da superfície da folha são pouco conhecidos. Um estudo realizado por Shepherd e colaboradores (2005) identificou altos níveis de uma proteína, na qual denominou filoplanina, em lavado foliar de *Nicotiana tabacum*, espécie que possui grande quantidade de tricomas. Essa proteína produzida pelo gene T-filoplanina apresentou atividade inibitória contra o patógeno oomyceto *Peronospora tabacina*, causador da doença potencialmente devastadora, mofo azul em tabaco (SHEWRY, 1991). A análise do promotor dessa proteína identificou sua biossíntese como sendo, exclusivamente nos tricomas glandulares curtos (sGSTs) e não nos tricomas glandulares longos (tGSTs). Mais tarde, estudos de silenciamento gênico da T-

filoplanina mediado por RNAi implicaram no aumento da suscetibilidade de plantas à infecção por *P. tabacina* nas folhas, e o ensaio feito com o lavado dessas folhas indicou a perda na capacidade de inibir a germinação dos esporos desse oomyceto (KROUMOVA; SHEPHERD; WAGNER, 2007).

Além das defesas inatas da planta, no filoplano ocorrem interações simbióticas com microrganismos. Essa relação tem sido demonstrada em estudos como sendo importante para a proteção da planta contra uma vasta gama de patógenos. Inclusive, esses microrganismos e seus compostos têm sido empregados há muitos anos no controle de pragas na agricultura como, por exemplo, a aplicação de esporos e proteínas do *Bacillus thuringiensis* como inseticidas durante quase um século (KROUMOVA; SHEPHERD; WAGNER, 2007).

Em vista disso, pode ser notada que a função de proteínas do filoplano é uma questão de extrema relevância a ser investigada em outras plantas na tentativa de buscar mecanismos de defesa no filoplano para impedir a germinação das hifas antes que elas se instalem no hospedeiro. Sendo assim, as proteínas secretadas para o filoplano nas plantas de *T. cacao* podem possuir atividade antifúngica, podendo apresentar um importante papel nos mecanismos iniciais de defesa do cacau contra fitopatógenos, incluindo o fungo *M. pernicioso*. Portanto, o objetivo desse trabalho foi identificar o gene da filoplanina no genoma do cacau, clonar, expressar e caracterizar essa proteína, quantificar os tricomas glandulares curtos (SGTs) na folha em genótipos contrastantes de cacau quanto à resistência a doenças, identificar proteínas do filoplano de *T. cacao* por meio da espectrometria de massas, bem como avaliar o efeito da lavagem foliar (por irrigação) sobre o índice de infecção destes dois genótipos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Histórico e importância do cacau

O cacau é uma planta nativa da Amazônia, sendo uma espécie de porte arbóreo, pertencente à família das Malváceas (ALVERSON et al., 1999) e tem como principal produto comercial suas amêndoas, as quais são utilizadas como matéria-prima do chocolate (SANTOS FILHO, 2008). Os primeiros colonizadores espanhóis ao chegarem à América, conheceram um fruto muito valioso para os povos nativos daquela região, o cacau, que já era cultivado pelos índios e, principalmente, pelos os Astecas, no México, e Maias, na América Central. As sementes dessa fruta eram consideradas tão valiosas que eram usadas como moeda. Peter Martyr da Argélia (África) descreveu em 1530, no livro DE ORBE NOVO PETRI MARTYRES AB ALGERIA o uso do cacau como moeda: “Abençoado dinheiro, que fornece uma doce bebida e é benefício para a humanidade, protegendo os seus possuidores contra a infernal peste da cobiça, pois não pode ser acumulado muito tempo nem escondido nos subterrâneos”. Além de valioso, o cacauero era considerado sagrado e chamado de *cacahuatl*, sendo cultivado acompanhado de solenes cerimônias religiosas ([www.ceplac.gov.br](http://www.ceplac.gov.br)).

O primeiro nome dado à árvore do cacau foi *Amygdalae pecuniariae*, que quer dizer “amêndoa-dinheiro”, por seu significado como moeda de intercâmbio. Entretanto, a primeira classificação botânica foi feita pelo sueco Carolus Linneus, que a nomeou de *T. cacao*, significando “cacau, alimento dos deuses” (VALENZUELA B, 2007).

O cacau aos poucos foi se disseminando no mundo inteiro e ganhando importância econômica devido ao aumento do consumo de chocolate. E assim, foram realizadas algumas tentativas de implantar a lavoura cacauera em diferentes regiões com solo e clima similares às do seu habitat de origem, como na América Central, América do Sul, Caribe, Ásia e África. Nesse



contexto, o cacau foi cultivado oficialmente no Brasil no ano de 1679, depois que os colonizadores passaram a fazer o cultivo em suas terras, sendo previamente autorizados através da Carta Régia. Somente no século XVIII, em 1746 o baiano Antônio Dias ao receber sementes de cacau do Pará doado pelo colonizador francês, chamado Luiz Frederico Wameau, introduziu o cultivo do cacauzeiro (Figura 1) no sul da Bahia, especificamente no município de Canavieiras às margens do rio Pardo e em 1752 foram feitos plantios no município de Ilhéus (SOUZA; DIAS, 2001).



**Figura 1.** Plântulas de *T. cacao* L. mantidas em casa de vegetação

## **2.2 Importância econômica do cacau**

Segundo Purdy e Schmidt (1996), o cacauzeiro se desenvolve bem em regiões cuja temperatura esteja acima de 15° C e uma precipitação anual de chuvas entre 1250 a 2800 mm. Essas condições são observadas nas maiores áreas produtoras de cacau e, em vista disso, o clima quente e úmido com chuvas bem distribuídas durante o ano, assim como os solos do sul da Bahia favoreceram à ótima adaptação do cacau nessa região, o que acarretou em muita prosperidade, principalmente para as cidades de Ilhéus, Itabuna e Camacã. O cultivo dessa frutífera consistiu num dos principais alicerces para o

desenvolvimento regional e o enriquecimento de muitos cacauicultores (CUENCA; NAZÁRIO, 2004).

O cacau representou para o Brasil uma importante fonte geradora de divisas em diversos Estados, assim como renda, emprego e melhoria na infraestrutura de muitas cidades da região cacaueira. Durante o período de 1975 a 1980, o cacau gerou 3 bilhões e 618 milhões de dólares para o Brasil, sendo gerado somente no ano de 1979 U\$ 922 milhões. Entre os anos 1986/1987, o Brasil teve sua maior produção chegando a 448.577 t de amêndoas secas, sendo que o Estado da Bahia, o maior produtor do país, produziu 397.362 t, ficando com uma produção de quase 90% da produção total, sendo o restante dividido entre os Estados do Espírito Santo e Amazônia. Em virtude dessa enorme produção, o país ocupou o segundo lugar na posição dos maiores produtores mundiais até 1989 (FAO, 2011).

O progresso do agronegócio de cacau nessa época se expandiu de tal maneira, que entre os produtores mundiais, o Brasil possuía o complexo agroindustrial exportador mais moderno, sendo implantado na região sul da Bahia, o maior parque processador de amêndoas de cacau, superando inclusive a capacidade de moagem dos Estados Unidos, Holanda, Alemanha e Rússia (MENEZES; CARMO-NETO, 1993). Segundo Bastos (1987), aproximadamente 90% da produção de cacau no Brasil era destinada a exportação, e a Bahia produzia 80%. A lavoura cacaueira baiana chegou a cultivar uma área superior a 700 mil hectares, compreendendo 106 municípios (SOUZA; DIAS, 2001).

A lavoura cacaueira atravessou algumas crises durante sua história, acometidas por diversos fatores, mas foi a partir da década de 90 que os cacauicultores enfrentaram a maior e mais duradoura crise, iniciada pelas mudanças climáticas que acarretaram em déficit hídrico nas principais regiões produtoras de cacau nos Estados da Bahia e Espírito Santo, além do diagnóstico da vassoura-de-bruxa na região sul da Bahia (PEREIRA et al, 1989).

O primeiro foco da doença nos cacauais baianos foi detectado na cidade de Uruçuca no ano de 1989, possivelmente trazido da Amazônia, e se disseminou facilmente nas propriedades produtoras, devido às condições

favoráveis de clima e plantações suscetíveis ao desenvolvimento do fungo. Com isso, a queda na produção, desvalorização do cacau e perda de mercado foram inevitáveis, afetando profundamente o sistema de agronegócio com impactos sócio-econômicos e ambientais, uma vez que houve redução da renda e endividamento do produtor, desemprego em massa estimado em 300 mil trabalhadores rurais, além do aumento intensivo no desmatamento da região cacauceira com o intuito de gerar renda com a venda de madeira (PEREIRA et al, 1989; VIRGENS FILHO et al., 1993; COUTO, 2000).

Em comparação a safra recorde do Brasil nos anos de 1986/1987 que foi acima de 400 mil toneladas de amêndoas, a produção caiu para 123 mil em 2000 e depois para 32 mil toneladas em 2002 (AGRIANUAL, 2004). De acordo com Santos Filho et al. (2008), no final da década de 70 a arroba chegou a ser negociada a R\$ 175,18, despencando para R\$ 59,50 entre os anos de 1990 a 2005, em valor atualizado para agosto de 2005. O país que ocupou a segunda posição no ranking de produtores mundiais de cacau na década de 80, deixou de ser um importante exportador para tornar-se também um importador em 1992, e atualmente ocupa a quinta posição, ao lado da Costa do Marfim, Gana, Nigéria e Camarões (FAO, 2011).

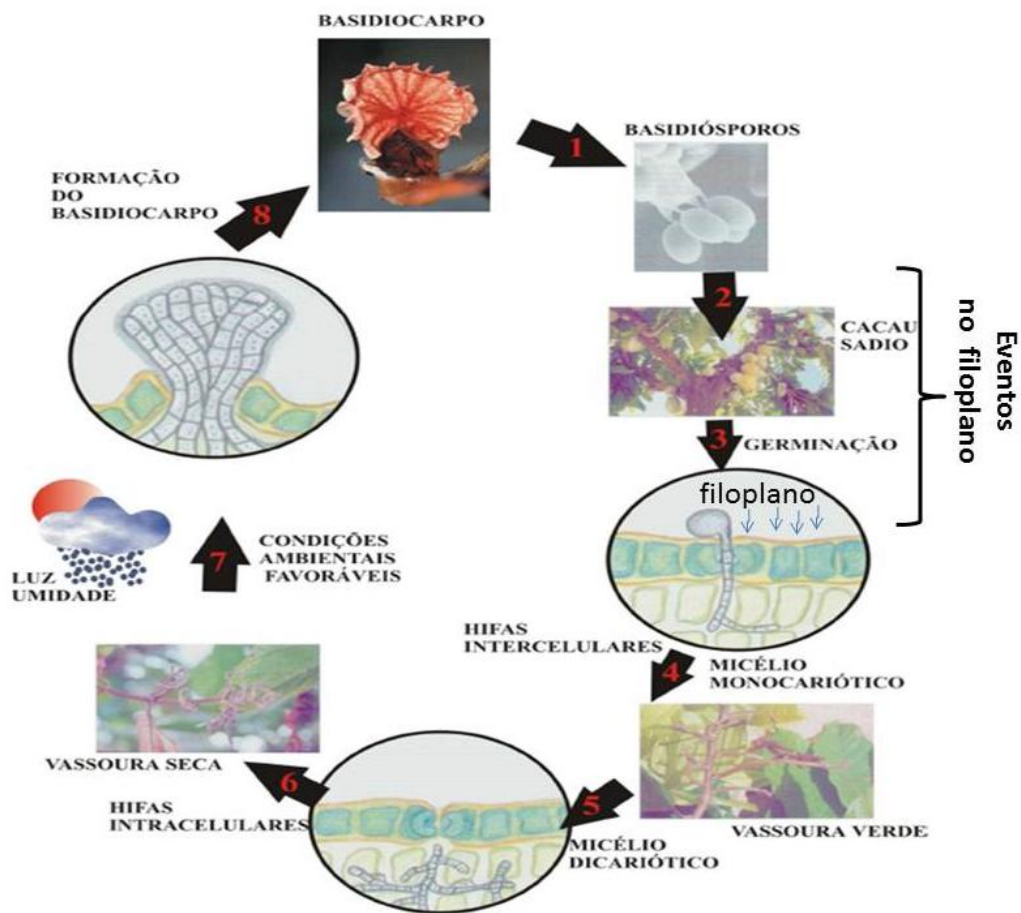
Muitos estudos foram realizados nos últimos 10 anos em diversas áreas de conhecimento, como exemplo, o desenvolvimento de plantas resistentes à vassoura-de-bruxa através de técnicas de clonagem pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC). A lavoura baiana vem ao longo dos anos recuperando aos poucos sua produção. O total de moagens de amêndoas de cacau da safra brasileira 2010/2011 somou 236.524,6 toneladas, com elevação de 5,7% em relação ao mesmo período de 2010, marcando um novo recorde comparado à produção dos anos após a instalação da vassoura-de-bruxa. A Bahia contribuiu com aproximadamente 76%, enquanto os 24% restantes foram de produção em outros Estados (CEPLAC, 2011b).

### **2.3 *Moniliophthora perniciosa***

O fungo causador da vassoura-de-bruxa, conhecido como *Moniliophthora perniciosa*, pertence à classe dos Basidiomycetes, da ordem Agaricales e família Marasmiaceae (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005) e é endêmico da região da Bacia Amazônica na América do Sul, assim como seu hospedeiro *T. cacao*. Nos países produtores de cacau da América do Sul e das ilhas do Caribe essa doença está entre uma das mais importantes (BASTOS, 1996; PURDY; SCHMIDT, 1996; GRIFFITH et al., 2003), causando uma enorme destruição e diminuição da produção cacaueteira no Brasil, alcançando perdas de até 70 a 90%, nas regiões Amazônica e no sul da Bahia (ALMEIDA; CHIACCHIO; ROCHA, 1997; SANTOS FILHO, 2008). Apesar da vassoura-de-bruxa não ter sido encontrada até o presente momento fora do continente americano, esta pode ser considerada uma forte ameaça ao continente africano e asiático, onde estão localizados os principais países produtores de cacau (DE ARRUDA et al., 2003).

*M. perniciosa*, por ser um patógeno hemibiotrófico, apresenta duas fases distintas durante seu ciclo de vida (Figura 2), uma fase biotrófica e uma fase necrotrófica. Essas fases provocam mudanças morfológicas, fisiológicas e histológicas nos tecidos do *T. cacao* afetados pela doença (ORCHARD et al., 1994; CEITA et al., 2007). Segundo Bastos (1990), os basidiósporos (esporos) são as estruturas infectivas do fungo, formados e liberados pelos basidiocarpos sob condições de clima quente (24 a 26°C) e úmido (80 a 90%), principalmente em período de chuva, sendo facilmente dispersados pelo vento e também pela chuva. Os esporos, por serem sensíveis à luz ultravioleta e também à baixa umidade relativa do ar, normalmente são liberados à noite ou nas primeiras horas da manhã, sendo o processo de infecção do cacau iniciado quando os tubos germinativos desses basidiósporos penetram principalmente os tecidos jovens de qualquer parte da planta, como meristemas, brotos, folhas jovens, almofadas florais, ou vagens jovens através de estômatos, epiderme e tricomas (SREENIVASAN; SABYDEEN, 1989; SILVA et al., 2002). Na fase biotrófica foi observado que o micélio do fungo é monocariótico, não possui grampos de conexão e cresce intercelularmente interferindo assim no balanço hormonal do hospedeiro, causando dessa forma hipertrofia das células, perda de dominância apical, bem como acentuada emissão de brotos laterais, ao qual

induz a formação de ramos anormais denominados vassoura-verde. Durante essa fase o fungo se alimenta dos nutrientes do hospedeiro em tecidos vivos, e após um período de infecção, ocorre uma transição para a fase necrotrófica, onde o fungo passa a crescer intracelularmente, suas hifas se tornam dicarióticas, há a presença de grampos de conexão, e nessa fase ocorre necrose e morte dos tecidos infectados, formando então a vassoura-seca (H.C, 1980). Nesses tecidos necróticos infectados é que são formados os basidiocarpos, sob condições favoráveis alternando entre períodos secos e úmidos, que produzirão os basidiósporos, reiniciando o ciclo de vida do *M. pernicioso* (HOLLIDAY, 1980 ; EVANS, 1980; LAWRENCE ET AL ., 1991) .



**Figura 2.** Ciclo de vida do fungo *M. pernicioso* (Modificado de Cotomacci, 2004).

## 2.4 Mecanismos de defesa da planta

Assim como os animais, as plantas estão constantemente expostas a diferentes tipos de estresses, seja este abiótico (variações bruscas de temperatura, umidade, radiação solar), ou biótico (ataque de insetos e patógenos, dentre outros). No entanto, as plantas no decorrer de sua evolução desenvolveram diversos mecanismos de defesa eficientes e diferenciados, de forma a superar danos causados por esses estresses e doenças de tal maneira que, mesmo que seu metabolismo e desenvolvimento sejam afetados, a planta consegue sobreviver e retornar ao seu metabolismo normal devido à sua enorme capacidade adaptativa (DE WIT, 2007).

Devido a isso, em Fitopatologia diz-se que imunidade é regra e suscetibilidade exceção. Independente da presença de patógenos, a planta desenvolve barreiras de proteção já existentes, possuindo dessa forma, resistência natural, sendo esta definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada de patógenos em seus tecidos (AGRIOS, 1997).

Estudos realizados nas mais diversas áreas de conhecimento identificaram que o sistema de defesa tem múltiplos componentes atuando de maneira sistêmica no momento e locais apropriados, sendo iniciado com o reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro, através de sinais provenientes do patógeno, em seguida, ocorrem mecanismos de transdução desses sinais externos, resultando em mudanças no metabolismo celular vegetal e expressão de genes específicos (WALTERS; NEWTON; LYON, 2007). Os mecanismos de resistência desenvolvidos pelas plantas podem ser estruturais e bioquímicos, subdivididos em pré e pós-formados, ou seja, já existem antes do ataque do patógeno ou ativam após sua chegada. Esses mecanismos variam de acordo com o patossistema e, no mesmo patossistema, depende da idade da planta, do estado nutricional, do tecido infectado e ainda das condições ambientais (JOHAL et al., 1995; PASCHOLATI; LEITE, 1995; ARGOUT et al., 2008; SILVA et al., 2008).

Pode-se citar como defesas estruturais pré-formadas da planta a cutícula, os tricomas, os estômatos, e os vasos condutores de seiva. Essas características que parecem meramente anatômicas têm papel importante na defesa do vegetal, pois atuam como barreiras físicas à penetração e/ou colonização do fitopatógeno. De acordo com Harrison e Davis (1988), diferenças anatômicas podem ser essenciais na questão de suscetibilidade e resistência de uma planta, assim como a densidade, por exemplo, de tricomas e estômatos por unidade de área podem representar uma resistência natural (SILVA et al., 2008). Entre as barreiras estruturais pós-formadas encontram-se a suberificação, lignificação, formação de papilas e de camadas de abscisão e de cortiça, bem como as tiloses.

Os mecanismos bioquímicos atuam inibindo o crescimento do patógeno ou provocando condições desfavoráveis para sua sobrevivência nos tecidos infectados da planta (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). Dentre as barreiras bioquímicas pré-formadas envolvidas na defesa do hospedeiro encontram-se os glicosídeos fenólicos, os glicosídeos cianogênicos, as fototoxinas, os fenóis e os alcalóides. Já os bioquímicos pós-formados englobam as fitoalexinas, as proteínas relacionadas à patogenicidade (PR), assim como a formação de radicais livres provenientes, sobretudo, do estresse oxidativo. Essas substâncias podem ser encontradas em baixos níveis de concentração, e uma vez que o vegetal sofre com diferentes estresses, incluindo ataque de patógeno, esses níveis se elevam a uma concentração adequada para tentar combater o estresse e/ou doença (STANGARLIN et al., 2011).

#### **2.4.1 Defesa no filopiano das folhas**

As superfícies das folhas, ou filopiano são comumente expostas a diversos microrganismos (CHISHOLM et al., 2006), tais como bactérias, fungos, vírus e nematódeos, que são depositados principalmente pelo vento, pela chuva ou por insetos. Entretanto, as plantas não conseguem escapar

desse acúmulo de microrganismos em seu filoplano por serem organismos sésseis (RODRIGUES; KERBAUY, 2009 ).

Dentre os patógenos que causam maior número de doenças em plantas encontram-se os fungos e os organismos que se assemelham morfológicamente aos fungos, causando uma perda anual de produção de aproximadamente 20% em todo o mundo, o que remete a uma necessidade em desenvolver fungicidas sintéticos para combater estes patógenos. A reprodução da maioria desses organismos é por meio de esporos que se dispersam pelo ar, explorando muitas vezes o filoplano das folhas como o primeiro ponto de contato para iniciar a germinação e posterior infecção nos tecidos vegetais. Contudo, para que ocorra o sucesso da germinação, os esporos precisam ultrapassar barreiras físicas e tolerar substâncias bioquímicas produzidas pela planta, além daquelas presentes na superfície foliar (SHEPHERD et al., 2005). A invasão e infecção do patógeno da vassoura-de-bruxa não são diferentes. Os esporos são liberados e o principal ponto de contato com seu hospedeiro são as folhas e tecidos meristemáticos, para então atingirem o interior dos tecidos da planta. Esse fungo precisa superar os compostos bioquímicos produzidos pelos tricomas e/ou secretados do interior da planta para o filoplano (SHEPHERD et al., 2005).

Entre as barreiras físicas na superfície foliar encontra-se a cutícula, uma cobertura de cera produzida pelas células epidérmicas foliares, que apesar de ser considerada uma barreira contra a desidratação, alguns estudos demonstram que a cutícula atua também como uma base de aderência para a colonização microbiana e como um impedimento à penetração de patógenos na folha (BEATTIE, 2002; CHRISTIANE, 2006). As aberturas naturais na superfície da folha são entradas importantes para muitos microrganismos, mas os estômatos, por exemplo, apesar de serem conhecidos por desempenharem papéis fundamentais como controle de água e trocas gasosas entre a planta e o ambiente, tem mostrado em recentes estudos que também podem desenvolver um papel ativo na limitação da invasão de bactérias patogênicas como parte do sistema imune inato de planta (BAKER; SALI, 2001). A depender da quantidade de estômatos, do tamanho e do período de abertura, os patógenos podem ter dificuldade no processo de penetração e



estabelecimento de relações parasitárias com o hospedeiro. O período de abertura dos estômatos também pode ser considerado mecanismo de resistência (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Outro exemplo de barreira física são os diversos tipos de tricomas, células especializadas da epiderme encontradas na maioria das angiospermas em diversas partes da planta, inclusive no filoplano e que exercem papéis fundamentais como absorção de água, aumento da reflectância luminosa, moderação da temperatura da folha, além de participarem da defesa das plantas contra insetos, pois a densidade dos tricomas na folha impede fisicamente a alimentação e a ovoposição de insetos e ácaros, bem como a nutrição de larvas (HARADA et al., 2010; KARIOTI et al., 2011).

Outra importante estratégia de defesa da superfície aérea são as secreções de substâncias bioquímicas antimicrobianas. Como exemplo, pode-se mencionar os hidatódios, que são estruturas especializadas conectadas ao xilema que podem ser encontradas, sobretudo nas folhas e liberam principalmente água durante a transpiração da planta. Nesse processo de transpiração, durante a abertura dos hidatódios muitos microrganismos inclusive os patogênicos podem penetrar na planta. Segundo estudos realizados por Grunwald (2003), com o fluido da transpiração, nessas estruturas também são secretadas compostos antimicrobianos. Nesse trabalho, proteínas constitutivas relacionadas à patogênese (PR) foram identificadas do fluido de gutação da cevada (*Hordeum vulgare L.*), o que indica que as plantas possuem um sistema de defesa na superfície da folha e aberturas (por exemplo, estômatos, hidatódios) que impede os estágios iniciais de infecção.

Muitas outras substâncias atuam na linha de defesa para impedir o crescimento de patógenos, sejam elas produzidas no interior da planta e secretadas para o exterior, ou produzidas por estruturas especializadas como os tricomas simples e glandulares presentes em várias partes da planta, inclusive na superfície foliar. Os tricomas glandulares estão presentes em aproximadamente 30% das plantas vasculares de diferentes famílias e produzem diversos metabólitos secundários antimicrobianos e contra a herbivoria como isoprenóides, fitoalexinas, terpenóides, glicosídeos (BOUVIER;

RAHIER; CAMARA, 2005; KARAMANOLI et al., 2005; KLIEBENSTEIN; ROWE; DENBY, 2005).

Metabólitos secundários são largamente pesquisados e documentados no que diz respeito ao seu potencial papel biológico (SURMACZ; SWIEZEWSKA, 2011), mas as primeiras proteínas de defesa secretadas para o filoplano foram identificadas recentemente como filoplanina. Essas proteínas foram encontradas no lavado foliar de *Nicotiana tabacum*, às quais inibiram a germinação dos esporos e a infecção da folha pelo patógeno oomycetes *Peronospora tabacina*, causador da doença mofo azul. Nesse trabalho, o autor isolou o gene T-phyloplanin para análise, desenvolveu estratégias de expressão da filoplanina na bactéria *Escherichia coli*, e ainda utilizando o promotor fusionado ao gene repórter  $\beta$ -glucuronidase e à proteína verde fluorescente – GFP - identificou o local da biossíntese dessa proteína apenas nos tricomas glandulares curtos (SHEPHERD et al., 2005).

O gene T-filoplanina é único no banco de dados de genes, mas sequências de EST de diversas espécies compartilham homologia com a filoplanina. Além disso, experimentos com lavado foliar de soja (*Glycine max*), girassol (*Helianthus annuus*), milho (*Zea mays*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) e batata (*Solanum tuberosum*) contém quantidades variadas de filoplaninas, mas essas proteínas não foram caracterizadas (SHEPHERD et al., 2005; SHEPHERD; WAGNER, 2007). Vale destacar que essas proteínas foram apenas visualizadas em SDS-PAGE de extrato do lavado foliar dessas espécies, mas nenhuma análise estrutural foi realizada para validar a identidade ou mesmo homologia com as T-filoplaninas.

A complexidade do filoplano aumenta devido às interações simbióticas que todas as plantas e animais estabelecem com micro-organismos e estes são transmitidos entre gerações (ZILBER-ROSENBERG; ROSENBERG, 2008). A superfície da folha abriga uma diversificada comunidade microbiana, incluindo numerosos gêneros de bactérias, fungos, leveduras e em algumas situações protozoários e nematódeos com os mais diversos estilos de vida, incluindo epífitas, saprofíticas e os patógenos. As bactérias são as mais abundantes com uma microbiota estimada em  $10^{26}$  células, algumas destas são capazes de causar doenças, mas a maioria vive em harmonia com seu

hospedeiro, inclusive desempenhando papéis importantes no crescimento, adaptação, evolução e defesa das plantas (LINDOW; BRANDL, 2003).

As fontes de micro-organismos podem ser múltiplas, chegando à superfície da folha pelo ar, através de insetos, sementes, animais e restos de culturas anteriores. Esta última, provavelmente representa a fonte mais importante para a colonização, pois deixa um grande número de bactérias já adaptadas ao filoplano (WHIPPS et al., 2008). A concentração de micro-organismos sobre o filoplano pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo idade da folha, temperatura, umidade, disponibilidade de nutrientes, viabilidade para reprodução, entre outros fatores (MORRIS; KINKEL, 2002) (INÁCIO et al., 2002).

Alguns estudos vêm sendo realizados ao longo dos anos com intuito de desvendar o papel da microbiologia da superfície dos vegetais, principalmente em relação a sua participação no sistema de defesa do seu hospedeiro. Muitos trabalhos reconhecem que estes microrganismos produzem e secretam os mais diversos compostos bioquímicos que estão envolvidos em inúmeras funções nas interações com as plantas (BRENCIC; WINANS, 2005; GUNATILAKA, 2006). Algumas dessas funções vêm sendo aos poucos desvendadas em todas as superfícies aéreas desde as raízes até as folhas, e é de conhecimento geral que inúmeras bactérias podem promover o crescimento de plantas, participarem de metabolismos como o do carbono e do nitrogênio, produzir proteínas que promovam a adaptação e resistência ao estresse, além de evitar a colonização e infecção dos tecidos por patógenos (LINDOW; BRANDL, 2003; WHIPPS et al., 2008; DELMOTTE et al., 2009). Da mesma forma, fungos endófitos de folhas protegem contra os herbívoros, os patógenos, além de aumentar a tolerância à seca (ARNOLD, 2003; SCHWEITZER et al., 2006).

Segundo von Borcke (2010), microrganismos e seus compostos têm sido utilizados há muitos anos no controle de pragas na agricultura como, por exemplo, a aplicação de esporos e proteínas do *Bacillus thuringiensis* como inseticidas durante quase um século. Nesse trabalho, proteínas da bactéria *Pseudomonas fluorescense* e do fungo *B. thuringiensis* têm sido clonadas e demonstradas que conferem resistência a um amplo espectro de defesa contra

patógenos em plantas transgênicas. A proteína da bactéria, por exemplo, induziu a resistência na planta a uma concentração extremamente baixa não só em relação a infecções bacterianas e fúngicas, mas também contra infecções virais, bem como alguma resistência a nematóides e insetos.

Outro trabalho mostrou que bactérias comensais como *Sphingomonas spp.* estavam envolvidas na proteção de *Arabidopsis thaliana* e eram eficazes contra uma ampla gama de patógenos foliares. Essas bactérias impediram a formação dos sintomas da doença causada pela bactéria *Pseudomonas syringae* e diminuíram o número de células patogênicas na planta (INNEREBNER; KNIEF; VORHOLT, 2011). Contudo, vale destacar que são escassos os estudos no sentido de identificar de forma global as proteínas do filoplano, seja elas produzidas pela planta ou pela gama de microrganismos presentes nesta interface da planta com o ambiente.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Mineração do gene de filoplanina

A sequência da filoplanina do *T. cacao* foi identificada por meio de busca por palavra-chaves com a palavra “phylloplanin” em um banco de dados de BLAST de EST's do cacau contra as sequências do Gene Bank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), organizado e coordenado pelo CIRAD- La Recherche Agronomique Pour Le Développement (<http://esttik.cirad.fr>) (ARGOUT et al., 2008). Essa sequência identificada no banco de EST's do cacau foi utilizada, mais tarde, para uma busca por meio de BLAST no banco genômico do cacau, disponibilizado em agosto de 2010 pela MARS Incorporated, com cerca de 35.000 genes ([www.cacaogenomedb.org/main](http://www.cacaogenomedb.org/main)).

#### 3.2 Análise do gene *TcPhyl*

Diferentes análises de bioinformática foram feitas com a sequência da filoplanina identificada no banco de ESTs (Expressed Sequence Tags) do cacau do CIRAD. O programa que busca similaridade entre sequências, o BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (ALTSCHUL et al., 1997), foi utilizado para identificar homólogos da sequência obtida a partir da biblioteca de EST do cacau dentre proteínas de diferentes espécies depositadas no GenBank. O íntron na sequência genômica foi identificado por meio de alinhamento do EST da filoplanina obtida do Cirad com a sequência de nucleotídeo obtida do banco genômico gerado pela Mars Incorporated, utilizando o ClustalW 2.0.12 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). A sequência de nucleotídeos foi traduzida para aminoácidos pelo programa Translate tool (<http://au.expasy.org/tools/dna.html>). Para a predição do ponto isoelétrico e a

massa molecular foi usado o Expasy-ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam>). O alinhamento entre a sequência aminoacídica da filoplanina do tabaco com a do cacau também foi realizado com o ClustalW 2.0.12. O algoritmo SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0>) foi utilizado para prever a presença e localização do peptídeo sinal. O mapa de restrição do gene foi feito com o Ncb cutter ([tools.neb.com/NEBcutter2](http://tools.neb.com/NEBcutter2)). O sítio +1 de transcrição no segmento genômico foi identificado com o programa Neural Network Promoter Prediction ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) enquanto o mapa físico da estrutura éxon-íntro-éxon do gene da filoplanina foi realizado com o programa do NCBI – Spidey (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/spideyweb.cgi>).

### 3.3 Clonagem

#### 3.3.1 Desenho de primers e preparo do fragmento de DNA e vetor de expressão

Primers para a amplificação da sequência *TcPhyl* foram especificamente desenhados, baseados tanto na identificação da ORF como também na análise do mapa de restrição do gene, visando a clonagem no vetor de expressão pET-28a, e posterior produção heteróloga da proteína. Os primers senso (F) e o antisenso (R) foram desenhados com sítios de restrição para as enzimas NdeI e XhoI, respectivamente como mostrados na Tabela 1. As temperaturas de anelamento dos primers ( $T_m$ ) foram calculadas pelo fabricante.

**Tabela 1.** Primers utilizados para amplificação do clone de cDNA obtido do CIRAD. O gene da filoplanina contido no banco de EST's do CIRAD foi amplificado com os primers forward

(TcPhyINdeIF) e reverse (TcPhyINdeI). Na tabela é mostrado a sequência de nucleotídeos com o sítio das enzimas de restrição utilizadas (NdeI e XhoI) sublinhados. T<sub>m</sub>, corresponde a temperatura de anelamento em NaCl a 50 mmol.L<sup>-1</sup>, indicada pelo fabricante.

Nomenclatura	Sequência de nucleotídeos	T <sub>m</sub> (°C)
TcPhyINdeIF	5' GAATT <u>CCATATG</u> GATGGCAACATGGGCGT 3'	62,7
TcPhyIXhoIR	5' GAATT <u>CTCGAG</u> GTTAAGTTGATGGTAAGAGC 3'	58,6

O cDNA do gene *TcPhyl* inserido no vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega), cedido pelo Dr. Xavier Argout do Cirad, foi diluído para as concentrações de 1:100, 1:1000 e 1:10000 e amplificado pela reação de polimerização em cadeia (PCR) com o kit da Fermentas. Para esta reação contendo um volume final 25 µL foi utilizado os primers específicos, diluídos para concentração de uso (10 nmol.L<sup>-1</sup>), o cofator MgCl<sub>2</sub>, tampão 10X para a Taq DNA polimerase, dNTPs numa concentração de uso de 2,5 mmol.L<sup>-1</sup>, a enzima Taq DNA polimerase, além de 1 µl do DNA plasmidial nas diferentes concentrações. O termociclador MJ - Research, modelo PTC - 200 foi utilizado para a reação de amplificação, utilizando as seguintes etapas: desnaturação inicial do DNA molde a 94 °C por 2 min, seguidos de 30 ciclos composto de: desnaturação de 94 °C por 45 s, anelamento dos primers a 55 °C por 45 s, adição dos deoxiribonucleotídeos na presença da Taq-polimerase a 72 °C por 60 s. Após esses ciclos foi feita uma extensão final no último ciclo de 72 °C por 10 min e ao final da amplificação a temperatura foi diminuída para 4 °C. O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1 %, corado com brometo de etídio 1 µg.mL<sup>-1</sup> e visualizado com luz UV para diagnosticar a presença do DNA de interesse no tamanho de 336 pb, sendo utilizado 5 µl da reação e 3 µl do marcador de DNA de 100 pb ou 1 Kb (Fermentas). O fragmento amplificado foi então purificado com o kit GFX (GE Healthcare), de acordo com as normas do fabricante, e novamente analisado em gel de agarose, corado com brometo de etídio para avaliar sua integridade e pureza. Confirmado sua pureza, o DNA foi digerido com as enzimas *NdeI* e *XhoI*, utilizando o tampão 10X e água ultrapura numa temperatura de 37 °C por 3hs, em seguida, a amostra foi colocada por 15 min a 85 °C para inativar as

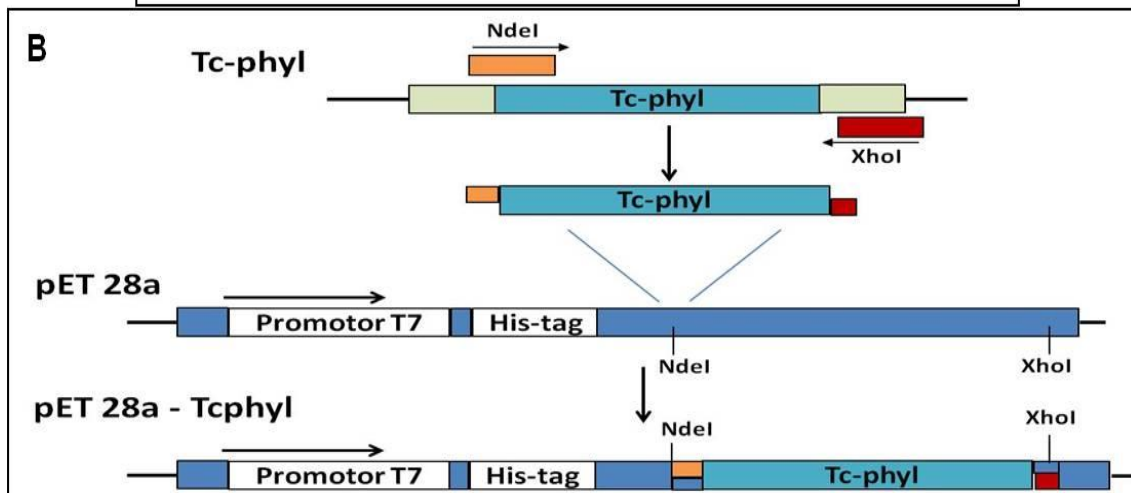
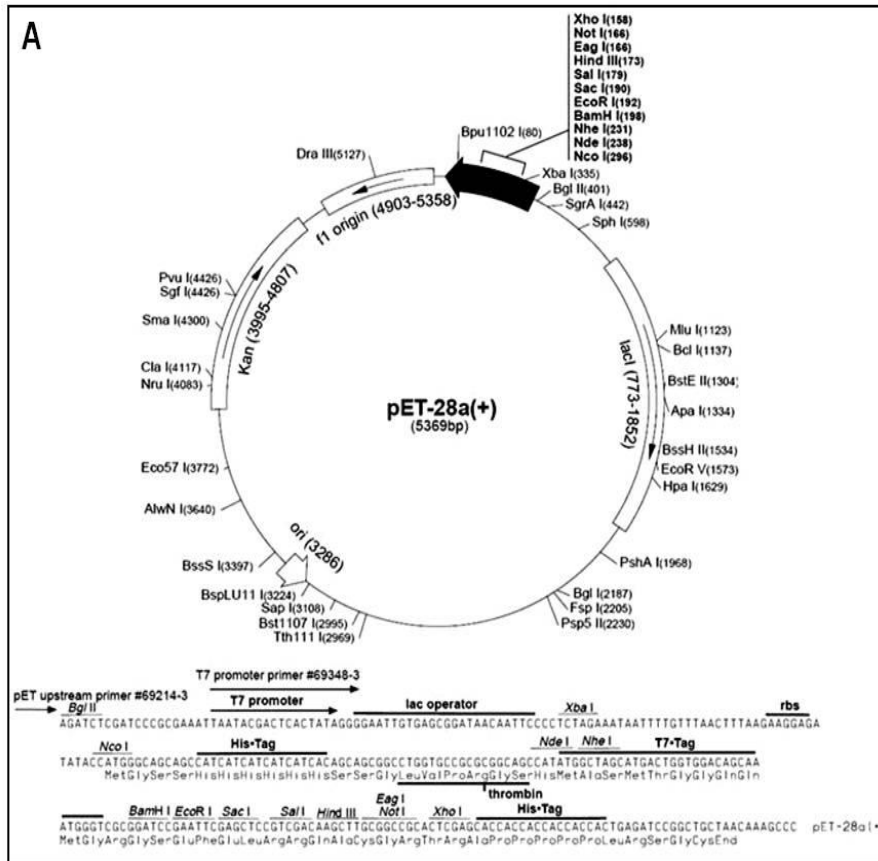
enzimas utilizadas na digestão. A amostra foi então purificada com GFX e analisada em gel de agarose.

O plasmídeo usado como vetor de expressão, pET28a (Novagen) (Figura 3A), possui um sítio múltiplo de clonagem, gene que confere resistência à kanamicina (Kan), operador Lac e cauda de seis histidinas (His Tag) na porção N-terminal. O fragmento de PCR foi clonado nesse sistema, sob controle do promotor da T<sub>7</sub> RNA Polimerase (Figura 3B). Esse vetor foi previamente preparado, sendo digerido a 37 °C por 16 h com as mesmas enzimas (*NdeI* e *XhoI*), na presença do tampão específico, depois tratado com a enzima fosfatase alcalina (CIAP-Alkaline Phosphatase Calf Intestinal) por 30 min a 37 °C para remover o grupo 5' fosfato e prevenir a recircularização do vetor. A reação foi incubada a 85 °C por 15 min para inativação de enzimas, e por fim, purificado com o kit GFX (GE Healthcare). Alíquotas de 3 µl do inserto e vetor diretos foram usados para análise por eletroforese em gel de agarose.

Amostras do DNA *TcPhyl* e do vetor pET-28a digeridos com as enzimas de restrição foram reunidos e ligados pela enzima T<sub>4</sub> ligase, a 23 °C por 1 h ou a 14 °C por 12-16 h num volume final de 20 µl, sendo utilizados para transformar células bacterianas. Uma reação controle foi preparada sem a amostra de inserto com o volume final completado com água ultrapura autoclavada.

Para a clonagem da sequência de filoplanina da MARS foi desenhado um novo primer forward e o primer reverse utilizou-se o mesmo desenhado anteriormente, uma vez que a nova sequência identificada completava a sequência do CIRAD que estava incompleta. Sendo assim, para amplificação do cDNA foi utilizado os pares de oligonucleotídeos mostrados na tabela 2. Os procedimentos seguintes realizados na purificação do DNA, no preparo do vetor pET-28a e na reação de ligase citados acima foram os mesmos empregados na sequência completa da MARS.





**Figura 3.** Plasmídeo pET-28a e estratégia de clonagem. A. Mapa do vetor de expressão pET-28a. A seta em negrito indica a região de “polylinker”, onde o inserto de interesse é inserido. Abaixo do mapa circular, encontra-se em detalhe a região do promotor, cauda de histidina e sítios de restrição (modificado do pET System manual – NOVAGEN). B. Estratégia de clonagem do inserto *TcPhyl* clivado do vetor pGEM-T Easy e inserido no sítio NdeI/ XhoI do vetor de expressão pET-28a, estando sob controle do promotor T7.

**Tabela 2.** Primers utilizados para amplificação da sequência codificadora da filoplanina do cacau gerada pela MARS. O cDNA de *TcPhyl* completo, contendo o peptídeo sinal identificado no banco de dados genômicos da MARS foi amplificado com os primers *forward* (TcPhylNdeI2) e o *reverse* (TcPhylXhoIR). A sequência de nucleotídeos com o sítio das enzimas de restrição utilizadas (*NdeI* e *XhoI*) e a temperatura de anelamento são mostrados na tabela.

Nomenclatura	Sequência de nucleotídeos	Tm (°C)
TcPhylNdeIF	5' GCATTGGCATCC <u>CATATG</u> GCCGAAGC 3'	65,7
TcPhylXhoIR	5' GAATT <u>CTCGAG</u> GTTAAGTTGATGGTAAGAGC 3'	58,6

### 3.3.2 Transformação de células de *E. coli*

As células quimicamente competentes de *E. coli TOP10* e *Rosetta (DE<sub>3</sub>)* foram preparadas segundo Sambrook et al. (1989). Alíquotas de *E. coli TOP10* foram degeladas em gelo e adicionado 10 µl da reação de ligase, tanto da reação que continha o DNA *TcPhyl* quanto da que não continha, sendo esta, o controle negativo (pET-28a sem inserto). As misturas foram incubadas a 0 °C por 30 min, e, depois foram transferidas para uma temperatura de 42 °C por 1 min e 30 s, causando um choque térmico. Isto tem a finalidade de abrir poros na membrana da bactéria, devido à diferença de temperatura entre o exterior e o interior da célula, facilitando a entrada do DNA exógeno.

Após a introdução do DNA à célula bacteriana foi adicionado 1 mL de meio líquido Luria Bertani (LB) sem antibiótico, uma vez que a estirpe *TOP10* não possui gene de resistência a antibiótico. As misturas contendo a bactéria transformada foram incubadas à 37 °C por 1 h, com o intuito de expressar o gene de resistência. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 2 min para concentrar as células, ressuspendidas em 200 µL de meio líquido LB e plaqueadas em placa de Petri contendo o antibiótico kanamicina 50 µg.mL<sup>-1</sup> (Kan50). Esse antibiótico foi selecionado, já que o plasmídeo de expressão possui resistência à kanamicina. Dessa forma, as células bacterianas possuindo o vetor recombinante pET28a-Tcphyl se tornam aptas a crescerem na presença desse antibiótico, enquanto outras colônias não se desenvolverão. As placas devidamente vedadas foram colocadas em estufa a 37 °C por 16 h

para promover a multiplicação bacteriana. Após esse tempo de incubação, uma amostragem aleatória de clones foi utilizada para a confirmação da clonagem através da PCR com os mesmos primers desenhados a partir do gene *TcPhyl*, e posteriormente, visualizados em gel de agarose.

Confirmada a transformação, preparou-se um pré-inóculo contendo 5 mL de meio LB, células de *E.coli TOP10* transformadas e 5µL do antibiótico de resistência, a Kan50. Depois a mistura foi incubada a 37 °C por 16 h. Os plasmídios recombinantes das colônias transformantes foram extraídos com o Kit para miniprep (QIAprep Spin Miniprep, Quiagen®), seguindo instruções do fabricante. Este DNA plasmidial (pet28a-Tcphyl) foi utilizado na transformação da bactéria *E. coli Rosetta (DE<sub>3</sub>)* para posterior expressão e purificação da proteína filoplanina recombinante (Tc-Filoplanina). A transformação foi realizada conforme descrito acima, e além do antibiótico Kan 50 foi acrescentado cloranfenicol 34 µg.mL<sup>-1</sup>, uma vez que essa estirpe *Rosetta (DE<sub>3</sub>)* apresenta gene de resistência para esse antibiótico.

Essa metodologia de clonagem empregada para a sequência da filoplanina obtida do CIRAD, mais tarde, foi utilizada para a sequência completa obtida da MARS.

### **3.4 Expressão da proteína recombinante filoplanina**

#### **3.4.1 Preparo do inóculo e indução da expressão com IPTG**

Para a expressão heteróloga da proteína filoplanina identificada no Cirad, e mais tarde na MARS, foram utilizados os mesmos protocolos de indução e extração proteica. Para isso, cultivou-se cepas bacterianas *Rosetta (DE<sub>3</sub>)*, contendo a construção pET28a-Tcphyl e também cepas contendo somente o plasmídeo pET28a, sem a inserção do fragmento, sendo este utilizado como controle da expressão. O preparo desses inóculos foi feito em 5 mL de meio LB, o qual continha 5 µL dos antibióticos Kan50 (50 µg.mL<sup>-1</sup>) e Clor34 (34 µg.mL<sup>-1</sup>), e foram incubados sob agitação de 180 rpm por 16 h a 37 °C. Após esse período de crescimento, os inóculos foram centrifugados a 5000

rpm durante 2 min. Os pellets formados foram ressuspensos com 200  $\mu$ L de meio LB e cada sobrenadante adicionado a 200 mL de circlegrow ou LB, contendo os antibióticos citados acima. Os erlenmeyers foram postos na mesma condição de agitação e temperatura por aproximadamente 4 h ou até as culturas atingirem uma densidade óptica (O.D) entre 0,7 e 1,0 com comprimento de onda de 600 nm. Atingida essa densidade, medida pelo espectrofotômetro, foi coletada uma alíquota das diferentes culturas e depois adicionado o indutor IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tio-galactopiranosídeo), um análogo estável da lactose que inativa o repressor Lac e induz a síntese de  $\beta$ -galactosidase, ativando dessa forma a transcrição e expressão de genes clonados sob controle do operon Lac. Após a adição do IPTG a uma concentração de 0,4 m.mol<sup>-1</sup>, as culturas foram mantidas sob agitação de 180 a 200 rpm por 4 h a 37 °C, e as amostras foram coletadas depois desse tempo de indução. Experimentos foram também realizados em temperaturas de 15 °C e 18 °C, sendo somente postas a essas temperaturas depois da adição do IPTG. Nessas condições, a incubação foi feita por em média 16-18 h, mantendo a mesma velocidade de rotação.

### **3.4.2 Extração de proteína por lise celular**

As culturas, após serem induzidas com IPTG, foram centrifugadas por 10 min a 10000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado ressuspensado em tampão de lise (50 mmol.L<sup>-1</sup> de tampão fosfato, 300 mmol.L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio, 40  $\mu$ L de Nonidet P-40), contendo lisozima a 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente ou a 30 °C por 30 min. Após essa etapa, as amostras foram colocadas no gelo e submetidas à lise celular por sonicação com sonda média (2 mm) a uma amplitude de 70 % por 10 min, sendo pulos de 10 s intercalado com 20 s de repouso em sonicador Ultrasonic (GEX 130, 130W).

Depois disso, foram coletadas desse extrato total 1 mL de cada amostra (controle e induzido), e para separar a fração solúvel da fração insolúvel as amostras foram centrifugadas 10000 rpm por 20 min a 4 °C. A fração solúvel

(sobrenadante) das amostras foi guardada a -20 °C, o corpo de inclusão da fração insolúvel (pellet) foi lavado com tampão de lise sem uréia e centrifugado. Em seguida, o pellet foi mais uma vez ressuspendido, para isso foi utilizado tampão de lise com uréia 6 mol.L<sup>-1</sup> e centrifugado novamente nas mesmas condições para remover restos celulares. O sobrenadante foi recolhido, armazenado a 20 °C e o precipitado descartado.

### **3.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida**

As frações das amostras coletadas sob diferentes condições, com e sem indução por IPTG, e em variadas temperaturas foram analisadas por SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis), com gel de separação a 15 % (Laemmli, 1970), usando o sistema de minicubas Mini-Protean II (Bio-Rad, Hercules, CA), de acordo com instruções do fabricante. As amostras foram preparadas diluindo-as em água deionizada e tampão de amostra 1X (Tris-HCl 12 mmol.L<sup>-1</sup> pH 6,8, glicerol 5 %, SDS 0,4 %, 2-mercaptoetanol 2 mmol.L<sup>-1</sup> e azul de bromofenol 0,02 %), aquecidas a 95 °C por 5 min e aplicadas ao gel.

A corrida foi realizada em tampão de corrida (Tris 0,025 mol.L<sup>-1</sup> pH 8.3, Glicina 0,19 mol.L<sup>-1</sup>, SDS 0.1 %.), sob voltagem de 150 Volts, 30 mA por em média 2 h ou até que o azul de bromofenol chegasse ao final do gel. Terminada a corrida o gel foi fixado por 10 min em tampão de fixação, contendo ácido acético 10 % e etanol 40%, e depois corado com o corante azul de comassie G-250 (NEUHOFF et al., 1988) por 12-16 h e depois descorados em água destilada sob leve agitação para visualização das proteínas. Feito isso, o gel foi digitalizado para análise utilizando o programa LabScanner.

### **3.5 Material vegetal**

Folhas jovens de *T. cacao* L., dos genótipos Catongo e CCN51, respectivamente suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa do cacauero,

foram coletadas para a extração de proteínas do filoplano. As coletas foram realizadas tanto em condições de campo, o catongo na Cabruca da UESC (Ilhéus-Ba) e o CCN51 no banco de germoplasma do Centro de Pesquisas do Cacau – CEPEC / CEPLAC, como também em casa-de-vegetação. Para tal, 300 sementes de cada genótipo em estudo foram germinadas e plantadas na casa-de-vegetação do CEPEC / SEFIT, sob luz natural a uma temperatura de 27 a 35 °C e irrigação no solo para evitar a lavagem das folhas.

### **3.5.1 Análises macroscópicas do filoplano do cacau**

A densidade de tricomas glandulares curtos (SGTs) por cm<sup>2</sup> foi determinado tanto em folhas jovens como também nos meristemas dos genótipos Catongo e CCN51. As folhas com 5 a 10 dias, medindo de 5 a 15 cm foram consideradas jovens e maduras aquelas com 30 a 40 dias de 15 a 20 cm de comprimento.

O delineamento foi inteiramente casualizado com seis repetições (3 plantas x 2 folhas). Em cada folha uma área de 1 cm<sup>2</sup> na porção da nervura central foi analisada em Lupa Leica EZ4D, com um aumento variando de 8 a 38 vezes, e fotografada utilizando o programa LAS EZ- Leica Application Suite-Version 1.4.0. A contagem dos tricomas foi feita manualmente. A quantificação dos tricomas foi mensurada fazendo uma média dos valores obtidos em cada folha analisada.

Para os meristemas os tricomas foram quantificados fazendo uma média dos valores obtidos em cada um dos quatro folíolos analisados. A contagem foi realizada com três plantas distintas de cada genótipo.

### **3.5.2 Extração de proteínas do filoplano**

A obtenção do lavado foliar foi realizada de acordo com Shepherd et al. (2005). As folhas coletadas foram lavadas com agitação suave por 30 s em um

béquer contendo 200-600 mL de água destilada, dependendo da quantidade de folhas a serem lavadas. Os pecíolos e folhas que apresentaram algum corte não foram expostos à lavagem. O lavado foliar foi filtro esterilizado em seringa com membrana de celulose 0,45  $\mu\text{m}$  seguido de 0,22  $\mu\text{m}$  para excluir fungos e bactérias. Em seguida, o lavado foi distribuído em tubos falcons de 50 mL, congelado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e liofilizado a vácuo até a completa eliminação da água da amostra. As proteínas das amostras foram precipitadas utilizando ácido tricloroacético (TCA) 10 % em acetona com 0,07 %  $\beta$ -mercaptoetanol na proporção de 1 mL a cada 5 falcons (50 mL) com amostra liofilizada. A mistura foi mantida no gelo por 30 min, centrifugada a 12000 rpm por 10 min e o sobrenadante descartado. As amostras, em seguida, foram lavadas com acetona 100 % contendo 0,07 %  $\beta$ -mercaptoetanol, retirado o excesso e deixado secar ao ar por 20 min. Uma porção da amostra foi ressuspensa em água, outra foi ressuspensa com tampão de amostra 1X e a outra porção ressuspensa em tampão de reidratação (uréia 7 mol.L<sup>-1</sup>, tiouréia 2 mol.L<sup>-1</sup>, CHAPS 1%, e traços de azul de bromofenol). As amostras foram sonicadas com 3 pulsos de 5 s a uma amplitude 40 %.

### **3.5.3 Dosagem de proteínas**

O lavado foliar ressuspensa em água foi submetido ao método de dosagem descrito por Bradford (1976) para determinar sua concentração proteica. BSA (albumina de soro bovino) foi utilizada como padrão. O método consiste na capacidade do corante azul de comassie G-250 em se ligar às proteínas presentes na amostra, ocorrendo dessa forma, uma mudança proporcional da cor, detectável numa absorbância de 595 nm. O homogeneizado dosado foi analisado por SDS-PAGE como citado no item 3.4.3. Para mensurar o conteúdo proteico da amostra ressuspensa em tampão de reidratação foi utilizado o *2D-Quant kit (GeHealthCare)*, seguindo orientações do fabricante, sendo também utilizado BSA como padrão e absorbância de 480 nm. Nesse caso, a amostra foi preparada para ser analisada em gel bidimensional (2D-PAGE).

### 3.5.4 Gel bidimensional

A eletroforese bidimensional combina dois diferentes processos de separação de proteínas: a focalização isoelétrica e a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida, na tentativa de visualizar o maior número possível de proteínas de uma amostra, baseado nas suas diferentes propriedades.

Com base nisso, foi utilizado no 2D-PAGE 350 µg de proteína diluída em 250 µL de tampão de reidratação (uréia 7 mol.L<sup>-1</sup>, tiouréia 2 mol.L<sup>-1</sup>, CHAPS 1 %, e traços de azul de bromofenol), contendo 50 mmol.L<sup>-1</sup> de ditionetrotiol (DTT) e 0,5 % de anfólitos (pH 3-10 NL). Esse homogeneizado foi colocado em sarcófagos (leito de cerâmica) sobre tiras de géis de poliacrilamida com pH imobilizado, conhecidas como *strips*, de 13 cm e pH variando de 3-10 (Amersham Biosciences, Immobiline™ Dry-Strip). Esse conjunto foi coberto com 1 mL de óleo mineral (*DryStrip Cover Fluid*) para evitar evaporação, seguida de cristalização da uréia durante a focalização isoelétrica (IEF) no sistema EthanIPGphor III (GE Healthcare). Primeiro, as *strips* foram reidratadas por 12 h a 20 °C, e só então se iniciou a fase da IEF, propriamente dita, onde as proteínas foram separadas nas tiras de gel. Nesse sistema, quando as proteínas atingem seu ponto isoelétrico, ou seja, um ponto onde a carga líquida é zero elas param de migrar. A corrida eletroforética ocorre em três etapas: 1 h a 500 Volts/h, 1 h 04 min a 1000 Volts/h, 2 h 30 min a 8000 Volts/h e 22 min a 8000 Volts/h. Depois do término da IEF, as *strips* foram incubadas em 7 mL de tampão de equilíbrio (uréia 6 mol.L<sup>-1</sup>, SDS 2 %, glicerol 30 %, Tris-HCl 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8.8) com 10 mg.mL<sup>-1</sup> DTT por 15 min, sob leve agitação, e novamente equilibradas na mesma quantidade de tampão de equilíbrio, só que dessa vez, contendo 25 mg.mL<sup>-1</sup> de iodoacetamida. Em seguida, as *strips* foram tratadas com 7 mL de tampão de corrida 1X (Tris 0,025 mol.L<sup>-1</sup>, Glicina 0,19 mol.L<sup>-1</sup>, SDS 0.1% e pH 8.3.), deixadas sob agitação por 15 min.



Uma vez reduzidas e alquiladas, as *strips* foram usadas para correr a segunda dimensão em gel desnaturante de poliacrilamida 12,5 %, utilizando o sistema de eletroforese vertical *SE600 Ruby* da *Amersham Bioscience*. Nesta dimensão, as proteínas são submetidas a um campo elétrico e são separadas de acordo com suas massas moleculares, utilizando um marcador de massa molecular de proteínas como padrão. A corrida foi feita com tampão de corrida 1X a 15 mA para cada gel por 15 min, e depois a 50 mA (para um gel) por 4 horas. Após a corrida, o gel foi fixado com solução contendo etanol 40 % e ácido acético 10 % durante 1 hora, em seguida, emergido em corante azul de comassie G-250 (0.08 %), sob agitação leve por cinco dias, e por fim, descorado com água destilada para a visualização dos “spots” proteicos. Os géis foram digitalizados com o auxílio de um scanner da *Amersham Bioscience*, *LabScanner*.

### **3.5.5 Digestão em gel e identificação por MS/MS**

Depois do gel 2-DE, *spots* de várias intensidades foram excisados dos géis, colocados em microtubos enumerados e digeridos com a enzima proteolítica tripsina, à qual quebra as ligações peptídicas das proteínas entre os aminoácidos arginina e lisina, exceto na presença da prolina, formando peptídeos. Para isso, as amostras foram submetidas à descoloração lavando três vezes com 200  $\mu\text{L}$  de bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) a 25  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  em acetronitrila pH 8, e o sobrenadante descartado. Os fragmentos de géis foram lavados com água deionizada, desidratados com 100  $\mu\text{L}$  de acetronitrila 100 % por 5 min, e depois secos no *SpeedVac* por 20 min ou até secar o gel. Para a tripsinização foi adicionado de 10-15  $\mu\text{L}$  de tripsina Gold (*Promega*) 25  $\eta\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  e os microtubos incubados a 4  $^\circ\text{C}$  por 10 minutos. Após a digestão, adicionou-se bicarbonato de amônio, os microtubos foram deixados a 37  $^\circ\text{C}$  por 16-24 h, os sobrenadantes transferidos para microtubos novos, devidamente enumerados. Adicionou-se 25-50  $\mu\text{L}$  de acetronitrila 50 % contendo ácido fórmico 5 % aos microtubos com gel, sendo agitados suavemente por 30 minutos e transferidos novamente para os tubos novos, por fim, o solvente

orgânico residual foi reduzido para 10 µL em Speed Vac (Eppendorf concentration 5301).

Alíquotas da digestão foram aplicados ao cromatógrafo líquido UPLC nanoAcquity (Waters, Milford, MA, EUA), acoplado ao espectrômetro de massas Micromass ESI-Q-TOF micro. Os peptídeos são separados e concentrados pelo cromatógrafo antes de serem analisados pelo MS/MS. No espectrômetro, os íons foram brandamente fragmentados e analisados pela sua relação massa/carga (m/z). Os espectros dos peptídeos tripticos foram detectados e analisados pelo programa ProteinLynx Global Server 4.2 (WATERS), sendo realizado uma comparação contra o banco de dados do *T. cacao* da MARS, SWISSPROT, MASCOT e NCBI, buscando dessa forma, a identificação das proteínas em estudo.

### **3.6 Inoculação do fungo *M. pernicioso***

Selecionaram-se para este experimento 300 plantas de *T. cacao* na casa de vegetação do CEPEC-CEPLAC, sendo 150 plantas da variedade suscetível (Catongo) e 150 da variedade resistente (CCN51). Os tratamentos prévios realizados com as plantas de cacau para inoculação do fitopatógeno foram as seguintes: no tratamento T1, 75 plantas de cada genótipo foram irrigadas por aspersão. No tratamento 2, as 150 plantas restantes (75 de Catongo e 75 de CCN51) teve somente o solo irrigado, não havendo aspersão nas folhas nem os meristemas.

Antes da inoculação, as folhas das plantas foram reduzidas em 1/3, com o intuito de acelerar o crescimento apical. A coleta de esporos e estocagem em nitrogênio líquido foi realizada conforme descrito por (FRIAS; PURDY, 1991). A diluição do inóculo em glicerol foi baseada em Frias et al., 1991, sendo a concentração ajustada para  $2 \times 10^5$  basidiósporos.mL<sup>-1</sup>. As plantas foram colocadas em câmara úmida e seus meristemas foram inoculados com gota de 20 µL contendo  $2 \times 10^5$  basidiósporos.mL<sup>-1</sup>. Ao término da inoculação, as plantas ficaram durante um período de 48 h a uma temperatura em torno de 25 °C e UR de 100% em câmara úmida. Passado esse período, as plantas foram

transferidas para a casa de vegetação sob condições ambientais, onde permaneceram por 45 dias. As plantas que estavam sendo irrigadas por aspersão continuaram sendo submetidas a esta irrigação, enquanto as plantas que tinham somente o solo irrigado mantiveram esse tratamento.

### **3.7 Avaliação dos sintomas**

Realizou-se nas plantas infectadas durante os períodos 15, 20, 25 e 30 dias após a inoculação a contagem do número de plantas que apresentaram presença ou ausência da vassoura-de-bruxa, de acordo com os sintomas apresentados. Anotou-se os tipos de vassouras formadas, o diâmetro e o comprimento das vassouras terminais, e a quantidade das vassouras axilares acima de 1 cm. Na análise dos dados foram consideradas as variáveis seguintes: **SINT** (porcentagem de plantas apresentando qualquer sintoma da doença, seja vassouras terminais, ou axilares, ou qualquer outro sintoma da doença) e **V-tot** (número total de vassouras, seja terminal, axilar e ou cotiledonar) de acordo com Gramacho et al (não publicado).

### **3.8 Análises estatísticas**

Os experimentos foram realizados com delineamento inteiramente casualizado, considerando cada planta uma repetição. Para cada genótipo de cacau foram feitas 75 repetições para cada tratamento, num total de 150 plantas por genótipo. As análises estatísticas de variância foram realizadas com o programa SAS (1988), utilizando modelo linear considerando todos os fatores como fixos. As médias aritméticas entre os tratamentos e genótipos, assim como as médias somente entre genótipos foram avaliados pelo Teste de Turkey ao nível de 5% de significância.

## 4. RESULTADOS

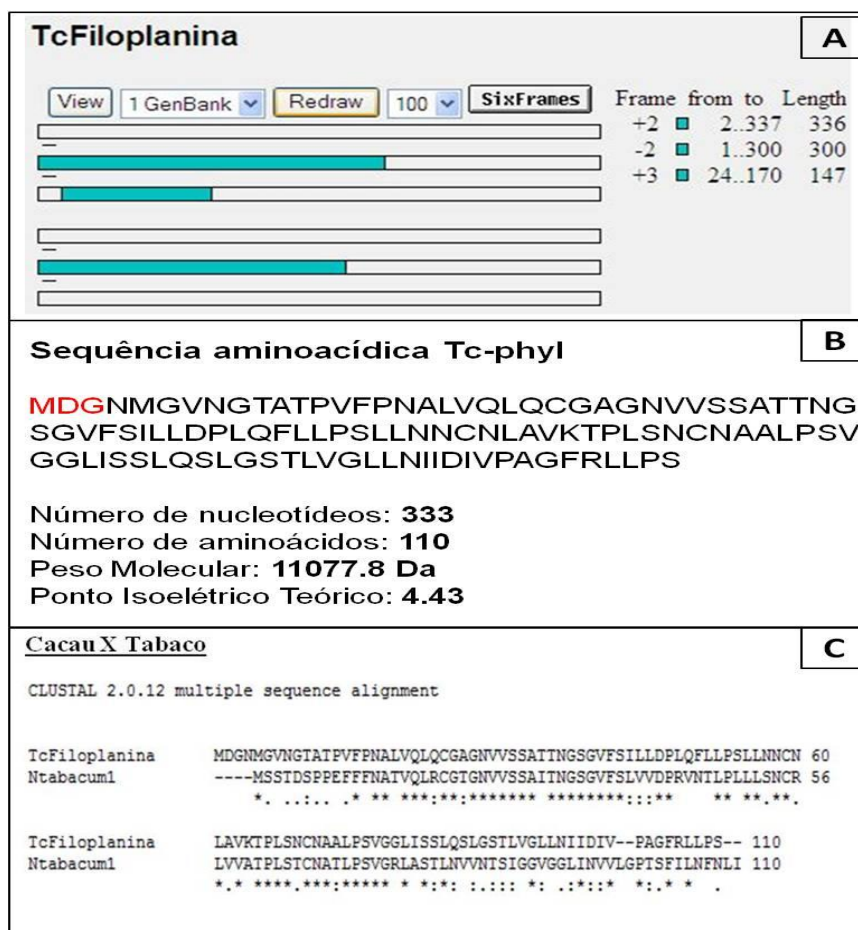
### 4.1 Análises do gene que codifica a proteína filoplanina no cacau

#### 4.1.1 Sequência identificada no CIRAD

A sequência de nucleotídeos do cDNA da filoplanina do cacau foi identificada no banco de EST's do CIRAD, sendo denominada *TcPhyl* (Figura 4). Todavia, para detectar as frames de leitura (ORFs) foi utilizando o programa ORF Finder que identificou três possíveis frames +2, -2 e +3 (Figura 5A), sendo selecionada a frame +2, a qual apresentou uma maior sequência, contendo 336 nucleotídeos que prediz uma proteína de 111 aminoácidos (aa), com ponto isoelétrico teórico de 4,43 e uma massa molecular teórica de 11 kDa estimados pelo ProtParam (Figura 5B). Essa sequência foi traduzida em aminoácidos pelo Translate tool e, em seguida, alinhada com a sequência aminoacídica, codificante da proteína filoplanina do tabaco utilizando o programa ClustalW (Figura 5C). O alinhamento apresentou uma similaridade de 72 % e uma identidade de 57 % entre as duas sequências aminoacídicas. As regiões mais conservadas foram as compreendidas entre os aminoácidos V20 e P47 e; T65 e G78 (Figura 5C).

```
> TcFiloplanina
TATGGATGGCAACATGGGCGTGAATGGCACTGCAACCCAGTTTTCCCTAA
TGCCCTGGTGCACTGCACTGTGGAGCTGGGAACGTGGTTTCCAGTGCAA
CAACCAATGGATCCGGGGTATTTCAATCCTGTTGGACCCGCTGCAATTTCT
TCTCCCTTCACTGCTGAACAACCTGCAACCTAGCAGTCAAAACCCCTCTCC
AATTGCAACGCGCGCTGCCATCCGTCGGGGGATTGATTTGTCCTTACAG
TCTCTAGGAAGCACCCCTCGTGGGCTCCTCAACATCATCGACATTGTCCCTG
CAGGATTTGGCTCTTACCATCAACTAAACCATCTGGATATCCATTTAAACAT
AAACATTTACCGAATATGCCATAATAAGGTTGGCCATTTTAAATGTTAAT
GACCACCACAATTTGATATTTCTTTTTTAAAGATTTAAACAAAAATTGTGTG
CTTTATGAAAGTATTGTAACCCCTACTAGCTTTCCCATGGAATAAAGTTGATA
TTTAGTCTAAAAAAAAAAAAAAAA
```

**Figura 4.** Sequência nucleotídica do cDNA da filoplanina do *T. cacao* identificada no banco de EST's do CIRAD. Os nucleotídeos ATG e TAA, em destaque, indicam os códons iniciador e terminador, respectivamente.



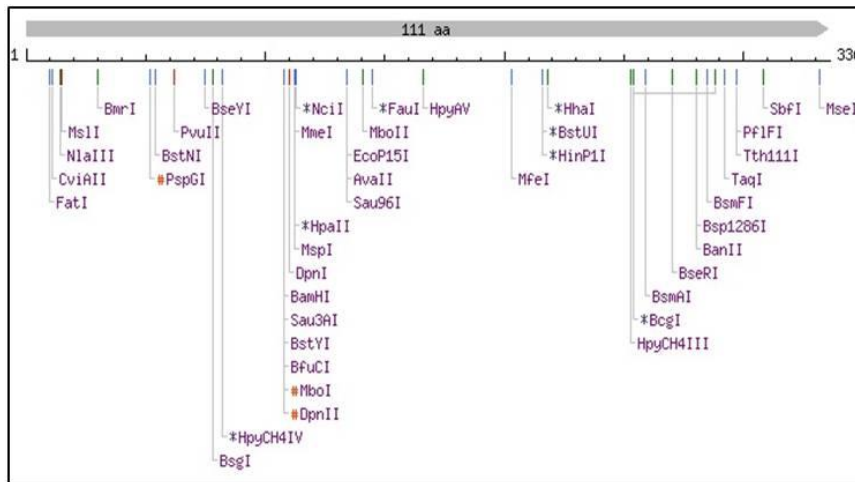
**Figura 5.** Análise do cDNA da filoplanina do cacau. A, ORFs identificadas pelo ORF Finder da sequência *TcPhyl*, sendo a frame +2 selecionada com 336 nucleotídeos. B, Sequência de aminoácidos traduzida pelo Translate tool, com uma proteína predita pelo ProtParam de 11 kDa. C, Alinhamento entre as sequências da filoplanina do cacau e tabaco realizado pelo ClustalW 2.0.12.

O algoritmo Blastp foi usado na busca por similaridades da sequência proteica da filoplanina com outras proteínas inseridas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Diversas sequências foram identificadas como tendo um alinhamento significativo, o que comprova a existência da proteína filoplanina em outras plantas como *Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera*, *Ricinus communis*, *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Nicotiana tabacum*, entre outras (Figura 6), sendo somente descrita e caracterizada como filoplanina em tabaco por Shepherd et al., (2005).

Sequences producing significant alignments:					
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	
<a href="#">XP_002315514.1</a>	predicted protein [Populus trichocarpa] >gb EEF01685.1  predicted p	<a href="#">151</a>	151	99%	
<a href="#">XP_002269079.1</a>	PREDICTED: phylloplanin [Vitis vinifera] >emb CBI22995.3  unnamed	<a href="#">148</a>	148	99%	
<a href="#">XP_002516941.1</a>	Phylloplanin precursor, putative [Ricinus communis] >gb EEF45555.1	<a href="#">124</a>	124	97%	
<a href="#">XP_002883017.1</a>	hypothetical protein ARALYDRAFT_318437 [Arabidopsis lyrata subsp.	<a href="#">116</a>	116	95%	
<a href="#">NP_188288.2</a>	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein [Arabidopsis thaliana]	<a href="#">113</a>	113	90%	
<a href="#">BAB02757.1</a>	unnamed protein product [Arabidopsis thaliana]	<a href="#">114</a>	114	90%	
<a href="#">XP_003533313.1</a>	PREDICTED: phylloplanin-like [Glycine max]	<a href="#">107</a>	107	97%	
<a href="#">ACU23306.1</a>	unknown [Glycine max]	<a href="#">105</a>	105	97%	
<a href="#">BAJ25793.1</a>	similar to T-phylloplanin [Nicotiana tabacum]	<a href="#">99.4</a>	99.4	91%	
<a href="#">BAJ25789.1</a>	similar to T-phylloplanin [Nicotiana tabacum]	<a href="#">99.8</a>	99.8	97%	
<a href="#">BAJ25791.1</a>	similar to T-phylloplanin [Nicotiana tabacum]	<a href="#">97.4</a>	97.4	97%	
<a href="#">BAJ25792.1</a>	similar to T-phylloplanin [Nicotiana tabacum]	<a href="#">95.9</a>	95.9	77%	
<a href="#">ABE03627.1</a>	phylloplanin [Nicotiana tabacum]	<a href="#">93.6</a>	93.6	84%	
<a href="#">NP_188289.1</a>	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein [Arabidopsis thaliana]	<a href="#">93.6</a>	93.6	90%	

**Figura 6.** Resultado do Blastp utilizando a sequência da proteína TcFiloplanina. Lista com número de acesso, descrição e pontuações e cobertura dos alinhamentos entre a TcFiloplanina e sequências não redundantes do Gene Bank. Em destaque (contorno em vermelho), a filoplanina descrita no tabaco.

A análise do gene feita com o programa SignalP 3.0 não identificou a presença de peptídeo sinal para a proteína predita, sugerindo que o cDNA *TcPhyl* está incompleto, uma vez que a proteína deve ser secretada para o filoplano das folhas. Sítios de clivagem por endonucleases de restrição da classe II foram detectadas no interior da sequência (Figura 7), sendo importante no desenho dos pares de primers para amplificação do fragmento de cDNA da filoplanina do cacau. Dessa forma, foi possível escolher as enzimas *NdeI* e *XhoI*, pois estas não clivam o fragmento e também estão presentes no sítio de clonagem do vetor escolhido para expressão.



**Figura 7.** Mapa de restrição apresentado pelo NEBcutter. A sequência codificadora da proteína filoplanina do *T. cacao* L., indicando os sítios de clivagens para enzimas da classe II ao longo do segmento de DNA.

#### 4.1.2 Sequência identificada no banco de sequências genômicas do cacau financiado pela MARS

Para análise do gene identificado no banco genômico completo do cacau foi aplicada a mesma metodologia descrita para a sequência do CIRAD. Todavia, foi identificado um gene maior do que o obtido no CIRAD, com uma frame de leitura selecionada no ORF finder contendo 477 nucleotídeos que é apresentada na figura 8. A sequência do CIRAD (sublinhada em azul) está com o códon iniciador em verde, já o códon terminador é comum as duas sequências e é marcado em vermelho. Análises no algoritmo ProtParam indicou uma proteína contendo 158 aminoácidos utilizando a sequência do genoma da MARS, com uma massa molecular predita de 16 kDa e ponto isoelétrico teórico de 7,60.

A sequência aminoacídica foi submetida ao programa SignalP 3.0, sendo detectado um peptídeo sinal com 25 aminoácidos (aa), com o provável sítio de clivagem entre os aminoácidos A19 e S20 (Figura 9).

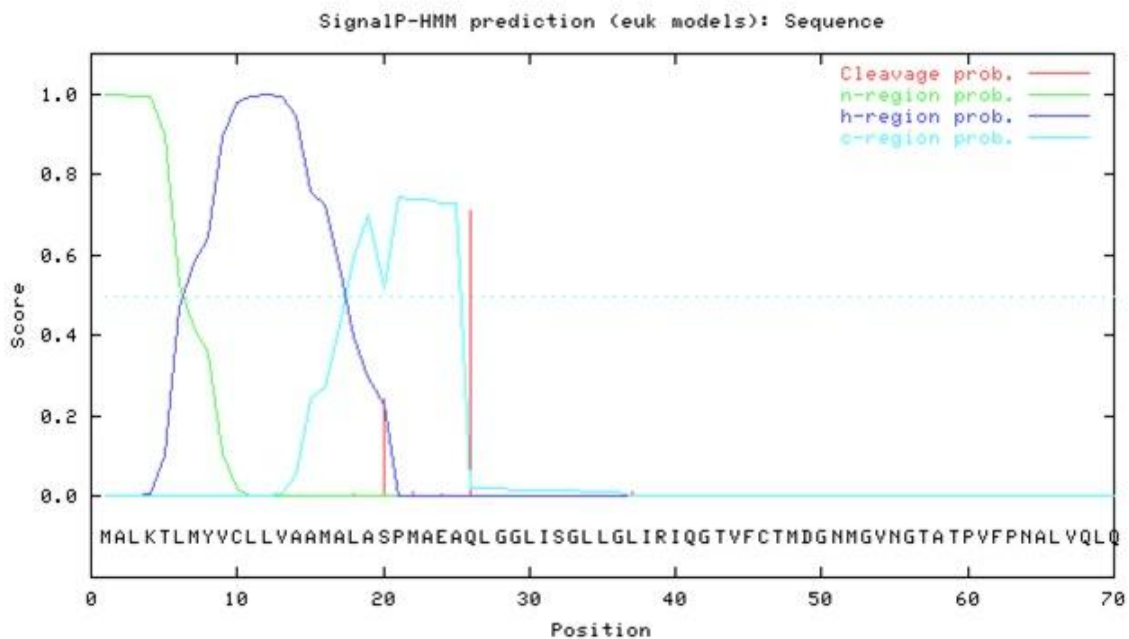
>**TcFiloplanina**

```

ATG SCCTTGAAAACCCCTGATGATGTTTGCCTCTTGGTGCCT
GCAATGGCATTGGCATCCCCAATGCCGAAGCCCAGCTAGG
TGGGCTTATCAGCGCCTCCTTGGCTTGATTGGAATCCAAGG
TACTGTATTTTGCACATGGATGGCAACATGGGCGTGAATGG
CACTGCAACCCCAGTTTTCCCTAATGCCCTGGTGCAGCTGCA
GTGTGGAGCTGGGAACGTGGTTTCCAGTGCAACAACCAATG
GATCCGGCGTATTCTCAATCCTGTTGGACCCGCTGCAATTTCT
TCTCCCTTCACTGCTGAACAACCTGCAACCTAGCAGTCAAAAC
CCCTCTCTCCAATTGCAACGCCGCGCTGCCATCCGTCGGGGG
ATTGATTTTCGTCCTTACAGTCTCTAGGAAGCACCTCGTCCG
GCTCCTCAACATCATCAACATTGTCCCTGCAGGATTCGGCTC
TTACCATCAACTAA

```

**Figura 8.** Sequência nucleotídica do cDNA da filoplanina identificada no genoma da MARS (www.cacaogenomedb.org/main). O gene da filoplanina de *T. cacao* identificado nesse Banco de dados genômicos do cacau foi analisado pela ferramenta ORF Finder para identificação da janela aberta de leitura (ORF). A sequência do CIRAD encontra-se sublinhada em azul com os códons iniciador circulado em verde e terminador em vermelho.

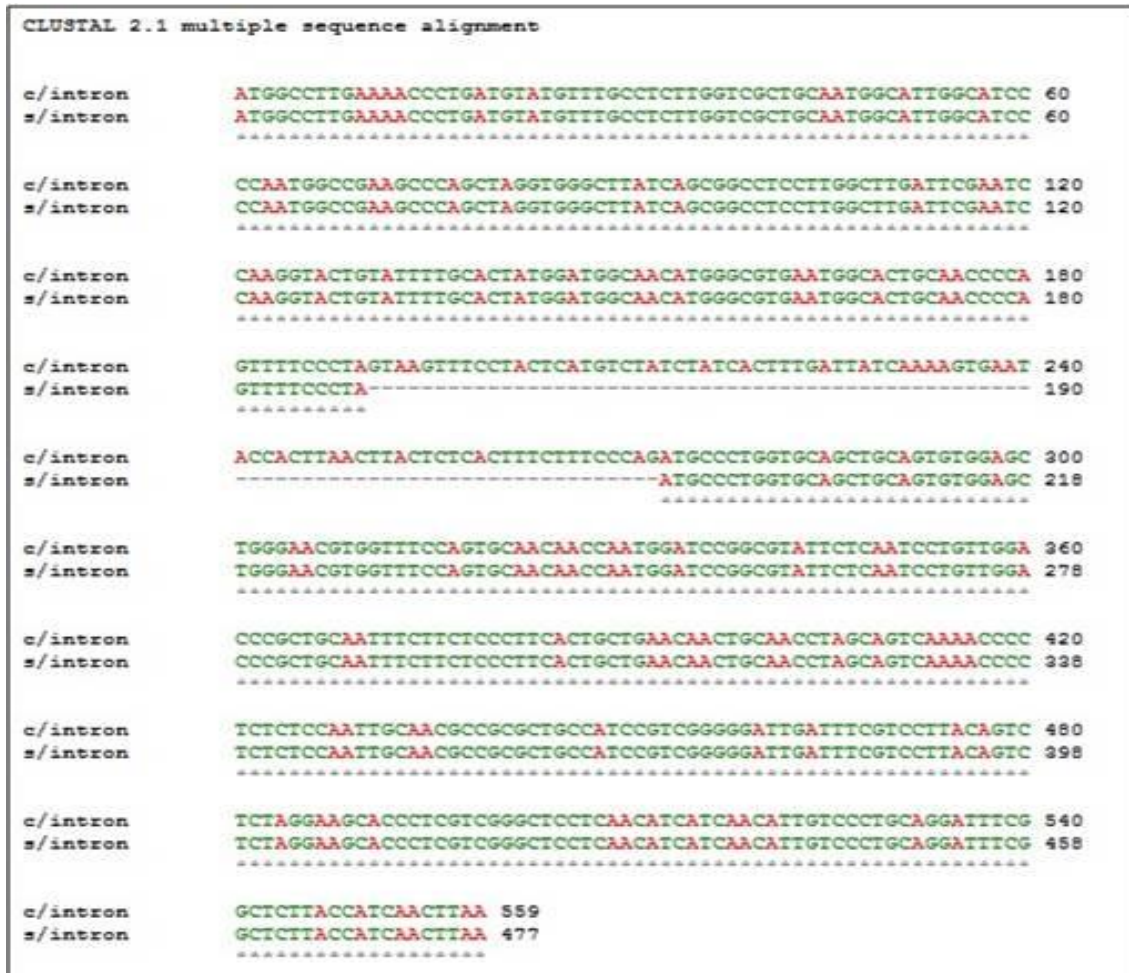


**Figura 9.** Resultado da predição do peptídeo sinal utilizando o programa SignalP 3.0. O provável ponto de clivagem do peptídeo sinal da sequência da MARS foi identificada entre os aminoácidos A19 e S20.

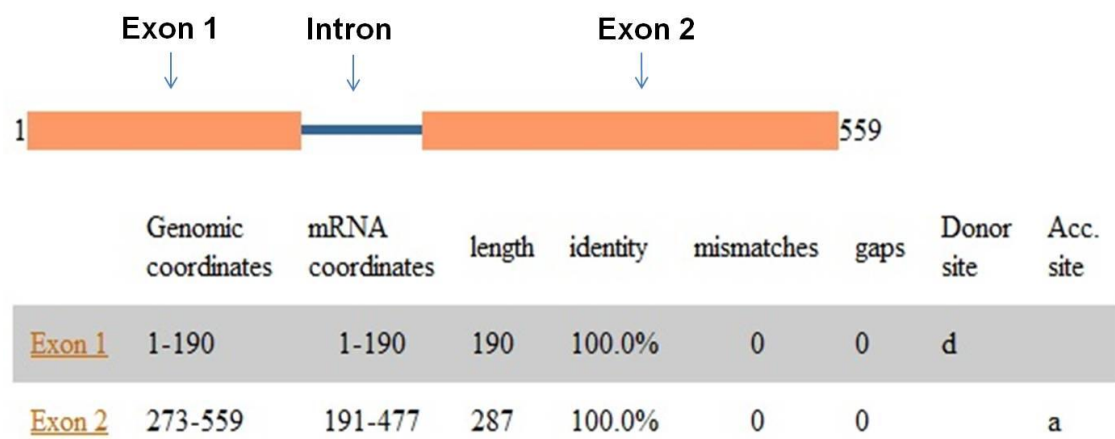
O alinhamento realizado entre a região codificante obtida do Genome Data Bank (com íntron) da MARS e o cDNA (sem íntron) obtido do banco de ESTs do CIRAD, realizado com o programa ClustalW, identificou a presença de apenas um íntron na região de 190 a 272, contendo 82 nucleotídeos (Figura 10). Na figura 11, o gene foi analisado pelo programa Spidey onde é



apresentado o mapa físico da sua estrutura éxon-ítron-éxon. Para isso foi alinhado a sequência predita para o transcrito primário a partir da sequência do DNA genômico e o mRNA maduro. O éxon 1 contém 190 pb e o éxon 2 contém 287 pb.



**Figura 10.** Alinhamento do cDNA da filoplanina obtido do banco de ESTs do CIRAD com a região codificante ainda com a presença do íntron encontrada no banco de dados genômicos da MARS. A linha pontilhada representa a remoção do intron no cDNA da filoplanina depois do mRNA maduro.

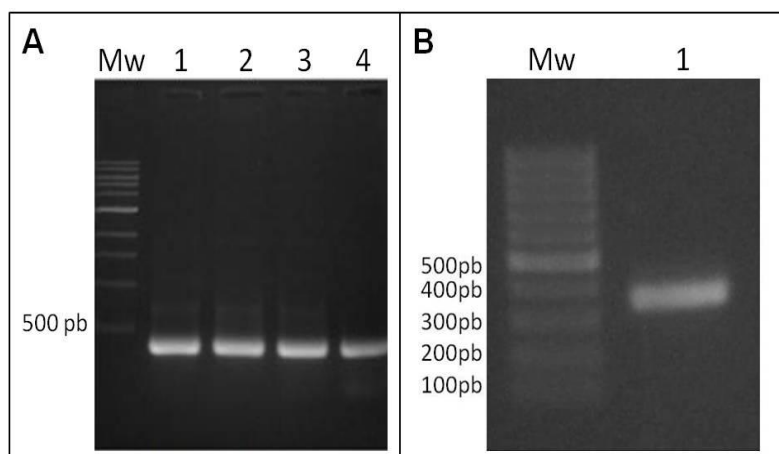


**Figura 11.** Mapa físico da estrutura éxon-íntron-éxon do gene *TcPhyl*. O gene apresenta dois éxons, nos tamanhos de 190 e 287 nucleotídeos, e apenas um íntron no tamanho de 82 pares de base que será removido para posterior produção da filoplanina.

## 4.2 Clonagem

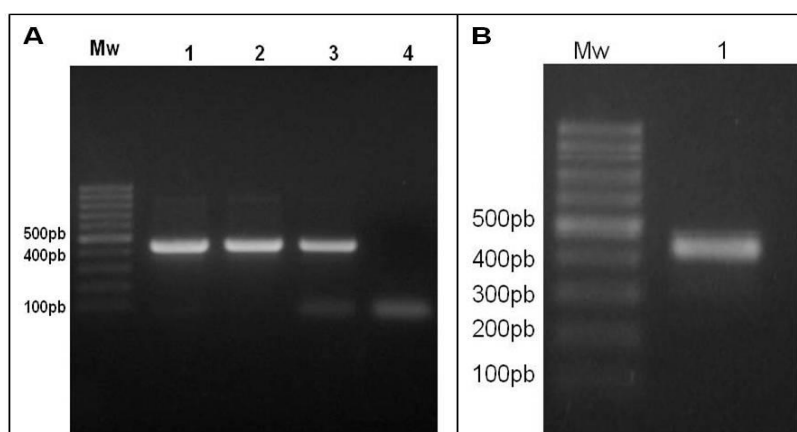
### 4.2.1 Amplificação, digestão e purificação do clone *TcPhyl*

O clone de cDNA cedido pelo Cirad inserido no vetor de clonagem pGEM-T Easy foi diluído e usado para a amplificação de um fragmento de 333 pb com primers específicos (Figura 12A). A amplificação pode ser observada para as diferentes diluições do DNA molde. O DNA foi digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, purificado e analisado em gel de agarose. Uma banda de aproximadamente 336 pares de bases é mostrada na figura 12B, uma vez que a banda está localizada entre 300 e 400 pb.



**Figura 12.** Amplificação do fragmento de *TcPhyl* do CIRAD. A. Amplificação do DNA. 1, DNA molde diluído (1:100); 2, DNA molde diluído (1:1000); 3, DNA molde diluído (1:10000); 4- DNA sem diluir; Mw, marcador de peso molecular 1Kb (Invitogen). B, clone digerido e purificado com GFX. Mw, marcador de 100 pb (Fermentas) e; 1, fragmento de DNA digerido com as enzimas *NdeI* e *XhoI*.

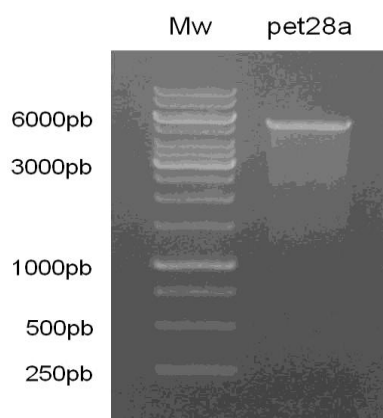
Para a amplificação da sequência de *TcPhyl* identificada na MARS foi utilizado os oligonucleotídeos descritos na tabela 2 e seguida a mesma metodologia para amplificação, digestão e purificação do inserto de interesse. Após análise em gel de agarose foi diagnosticado a presença do fragmento no tamanho esperado entre 400 e 500 pb, uma sequência maior que aquela do CIRAD (Figura 13A). O DNA foi então digerido com as mesmas enzimas, *NdeI* e *XhoI*, purificado com o kit de purificação e analisado em gel de agarose (Figura 13B).



**Figura 13.** Amplificação e clivagem do *TcPhyl* da MARS. Em A, 1, corresponde a amplificação do DNA molde diluído (1:100); 2, DNA molde diluído (1:1000); 3, DNA molde diluído (1:10000); 4, controle negativo; Em B, 1 corresponde ao produto da amplificação clivado com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* e purificado. Mw, marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas).

#### 4.2.2. Digestão e purificação do vetor de expressão pET 28a

O plasmídio pET-28a com 5369 pb foi clivado com as mesmas enzimas de restrição (*NdeI* e *XhoI*) usadas na digestão do fragmento de TcPhyl. A digestão e purificação do vetor foram eficientes, uma vez que foi detectada somente uma banda mostrando o plasmídeo na sua forma linear (Figura 14).

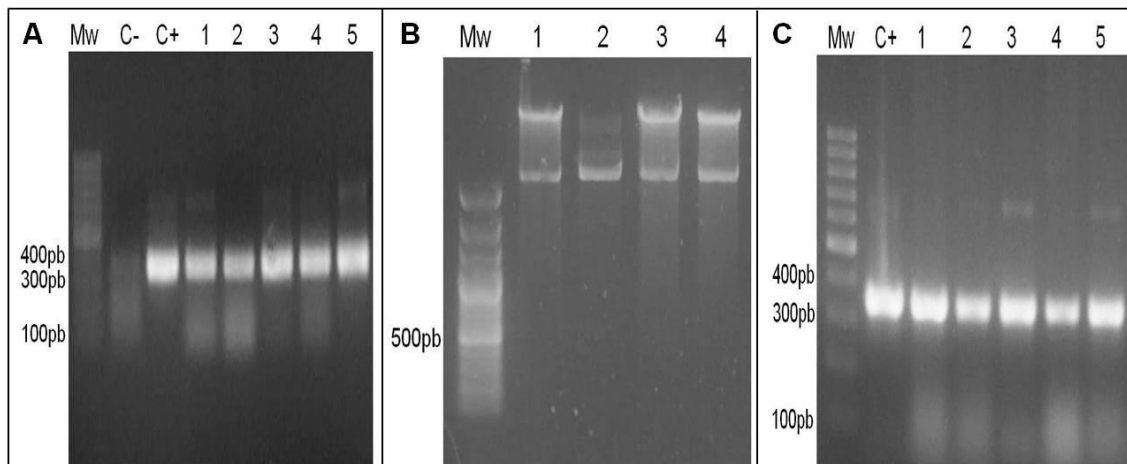


**Figura 14.** Digestão do vetor pET-28a. Mw, Marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas); 1- Plasmídeo digerido com as enzimas *NdeI*/*XhoI* e desfosforilado com fosfatase alcalina.

#### 4.2.3 Transformação de *E. coli* com plasmídeo recombinante

Após a ligação dos produtos digeridos (fragmento de DNA e vetor), o plasmídeo recombinante (pET28a-Tcphyl) foi inserido em *E. coli* das estirpes *TOP10*. A Figura 15 mostra o resultado da reação de PCR de cinco clones dessa transformação, indicando a presença do inserto no tamanho esperado de 333pb. As colônias foram selecionadas aleatoriamente na placa de ágar e submetidas à reação de PCR. Todas as colônias amplificaram o fragmento, conforme comparação com controle positivo utilizando o clone original do Cirad como molde nas reações de amplificação (Figura 15, canaleta 2).

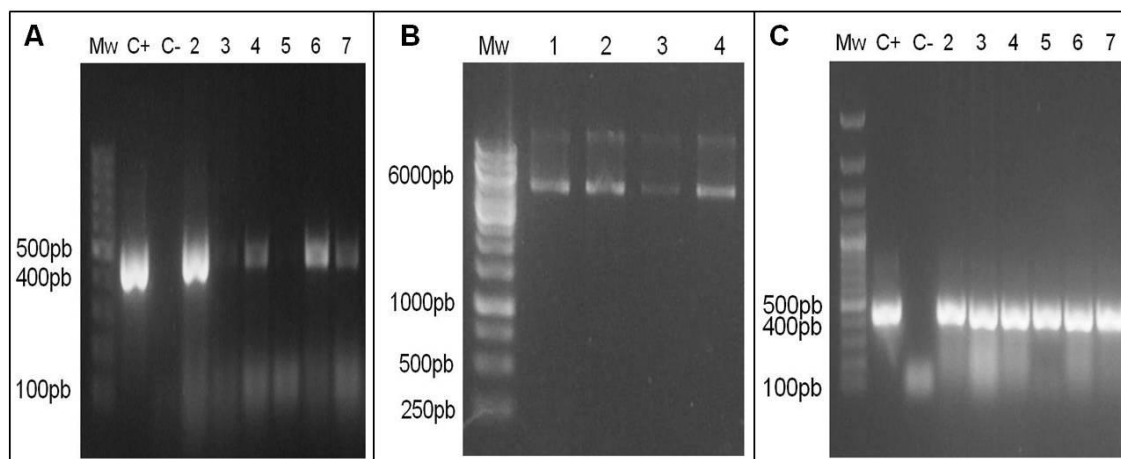
A partir disso, foi feita a extração dos plasmídeos pEt28a-Tcphyl das células bacterianas, sendo visualizadas em gel de agarose 1 % (Fig. 15B). O produto dessa extração, contendo somente plasmídeos recombinantes foi usado para transformar células de *Rosetta (DE<sub>3</sub>)* e a presença do fragmento é confirmada na Figura 15C.



**Figura 15.** Diagnóstico de transformação em *E. coli* TOP10 e Rosetta DE3 (CIRAD). Em A, Colônias de TOP10 transformadas com pET28a-TcPhyl. Mw, Marcador de DNA 100 pb (Fermentas); C-, Controle negativo; C+, Controle positivo (*TcPhyl*); 1 a 5, Colônias com plasmídeo recombinante. Em B, Plasmídeo recombinante extraído de células de TOP10. Mw, Marcador de DNA 1 Kb (Fermentas); 1 a 4, Miniprep de quatro colônias distintas. Em C, Colônias de *Rosetta* (*DE<sub>3</sub>*) submetidas à transformação com pET28a-TcPhy. Mw, Marcador de DNA 100 pb (Fermentas).

Os plasmídeos recombinantes contendo o fragmento de DNA amplificado, a partir da sequência da MARS foi também inserido em bactéria utilizando o mesmo procedimento mostrado anteriormente. Uma reação de PCR foi realizada com as colônias crescidas em placa de ágar. O diagnóstico da transformação em células de TOP10 detectou a presença do inserto da filoplanina em algumas bactérias no tamanho esperado nas colônias 2, 3, 4, 6 e 7 e, na colônia 5 não foi identificado o fragmento (Figura 16A). Uma banda entre 400 e 500 pb foi amplificada, confirmando a presença do inserto no tamanho esperado de 477 nucleotídeos, comparado com a reação controle contendo o DNA da filoplanina.

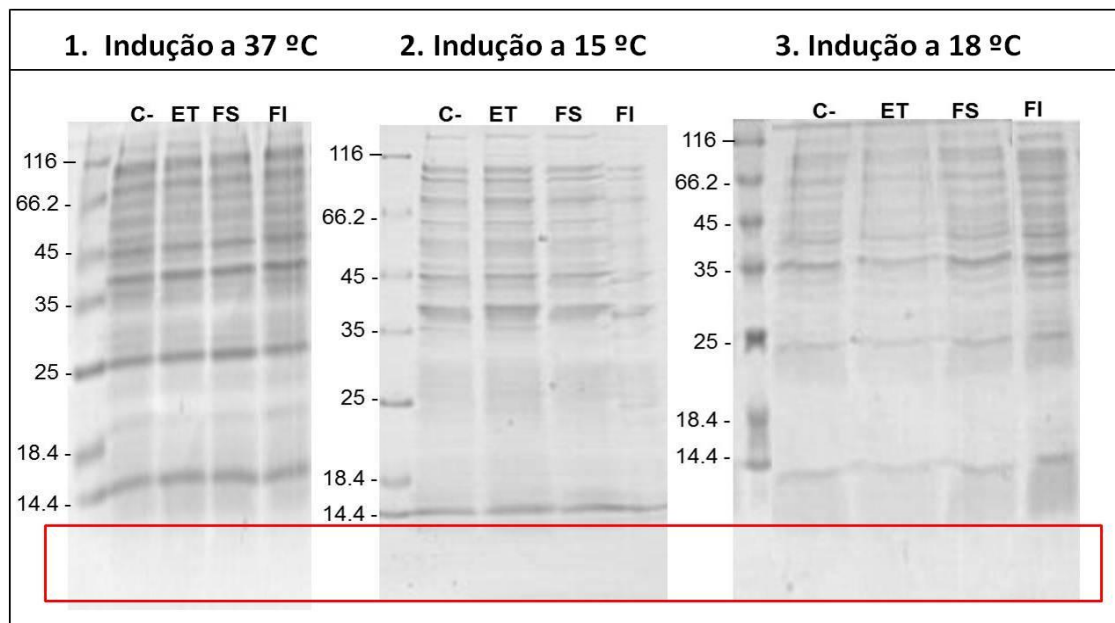
O plasmídeo recombinante foi recuperado por meio de minipreparações com o kit Miniprep (QIAprep Spin Miniprep, Quiagen®) e, depois analisado em gel de agarose (Figura 16B). Em seguida, uma alíquota da amostra contendo o plasmídeo recombinante foi utilizada para realização da transformação em *Rosetta* (*DE<sub>3</sub>*), a qual foi confirmada por PCR e análise em gel de agarose. O resultado demonstrou todas as colônias como sendo positivas (Figura 16C).



**Figura 16.** Diagnóstico de transformação em *E. coli* TOP10 e Rosetta DE3 (MARS). Em A, Colônias de *TOP10*. Mw - Marcador de DNA 100 pb (Fermentas); C+, Controle positivo (*TcPhy*); C-, Controle negativo; 2 a 7, Colônias contendo plasmídeo recombinante. Em B, Plasmídeo extraído das células transformantes de *TOP10*. Mw, Marcador de DNA 1 Kb (Fermentas); 1 a 4, Miniprep de quatro colônias distintas. Em C, Colônias de *Rosetta (DE<sub>3</sub>)*. Mw, Marcador de DNA 100 pb (Invitrogen); C+, Controle positivo (*TcPhy*); C-, Controle negativo; 2 a 7, Colônias contendo plasmídeo recombinante.

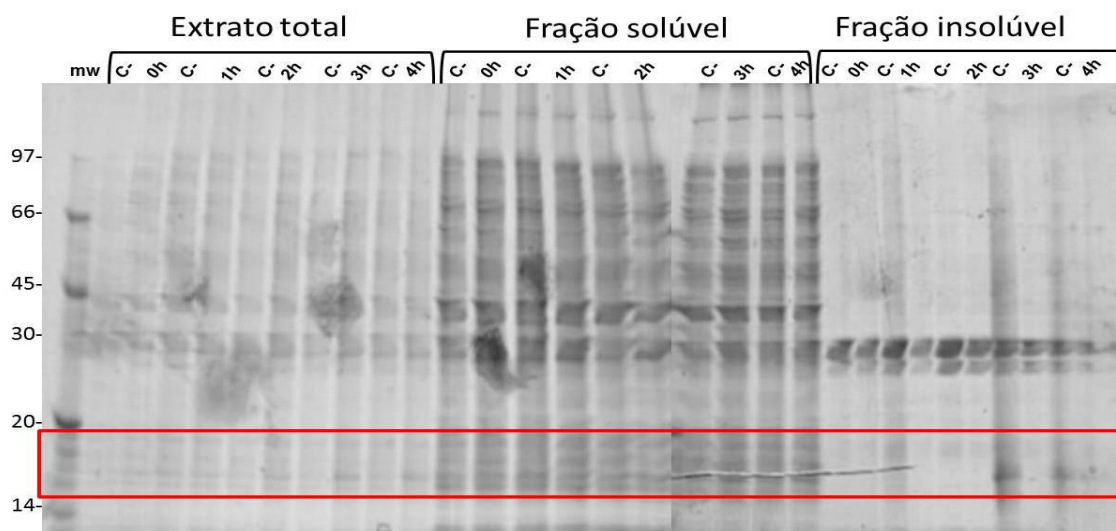
### 4.3 Expressão da proteína filoplanina em sistema heterólogo

A indução da expressão da filoplanina foi realizada em diferentes condições de temperatura (37, 15 e 18 °C) a uma concentração final de IPTG de 0,4 mmol.L<sup>-1</sup>, sob agitação de 180 a 200 rpm. Em nenhuma das condições testadas ocorreu a expressão e acúmulo da proteína, como mostrado no gel de poli-acrilamida, que em nenhuma das frações (extrato total, fração solúvel e fração insolúvel) foi identificada banda diferencial na faixa em destaque, em relação à amostra referência não induzida (Figura 17), uma vez que a filoplanina apresentou uma massa molecular teórica de 11 kDa.



**Figura 17.** Indução da proteína filoplanina com adição de IPTG (CIRAD). 1, Expressão da proteína induzida a uma temperatura de 37°C; 2, Proteína induzida a 15°C; 3, Proteína induzida a 18°C. Nos géis 2 e 3, as bactérias foram postas em crescimento sob agitação a temperatura de 37°C nas quatro primeiras horas e, após adição do IPTG foram submetidas à diminuição de temperatura no período de 12-16 horas; MW, marcador massa molecular de proteínas (Fermentas); C-, pET-28a não induzido; ET, Extrato total da amostra induzida; FS, Fração solúvel induzida; FI, Fração insolúvel induzida.

A mesma metodologia foi utilizada para indução da proteína obtida a partir da MARS, sob diferentes temperaturas. Mas, apesar das tentativas, a expressão da proteína não foi visualizada nos géis de poliacrilamida em nenhuma das três frações coletadas: extrato total, fração solúvel e fração insolúvel (Figura 18). Nesta figura mostra o controle não induzido e todas as suas frações, assim como as alíquotas coletadas do meio de cultura nos tempo de 1, 2, 3 e 4 horas após indução com IPTG.

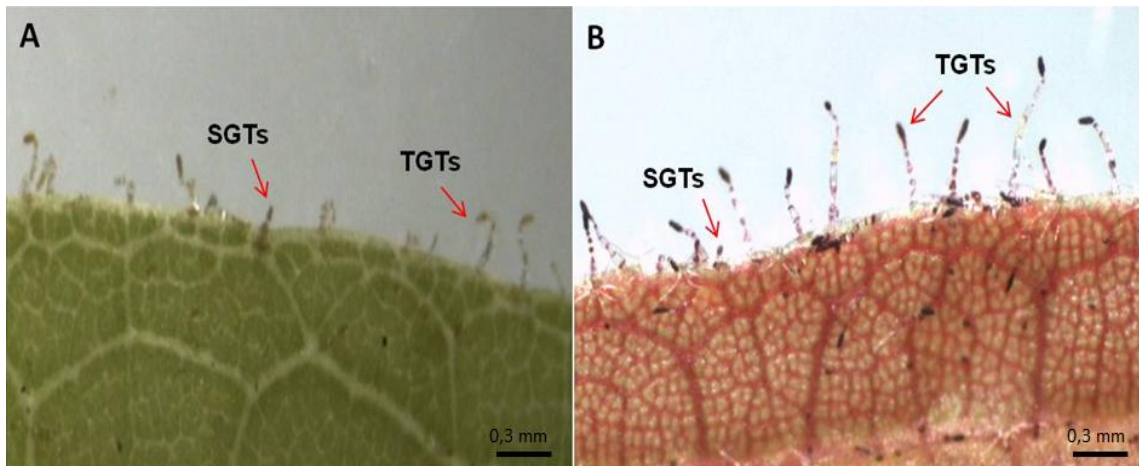


**Figura 18.** Indução da proteína filoplanina a 37 °C (MARS). MW, marcador de proteínas (Fermentas); C., Controle negativo (pET-28a sem inserto). 0h, 1h, 2h, 3h e 4h, Tempos nos quais foram coletadas as três frações das amostras contendo *TcPhyl* induzidas com IPTG.

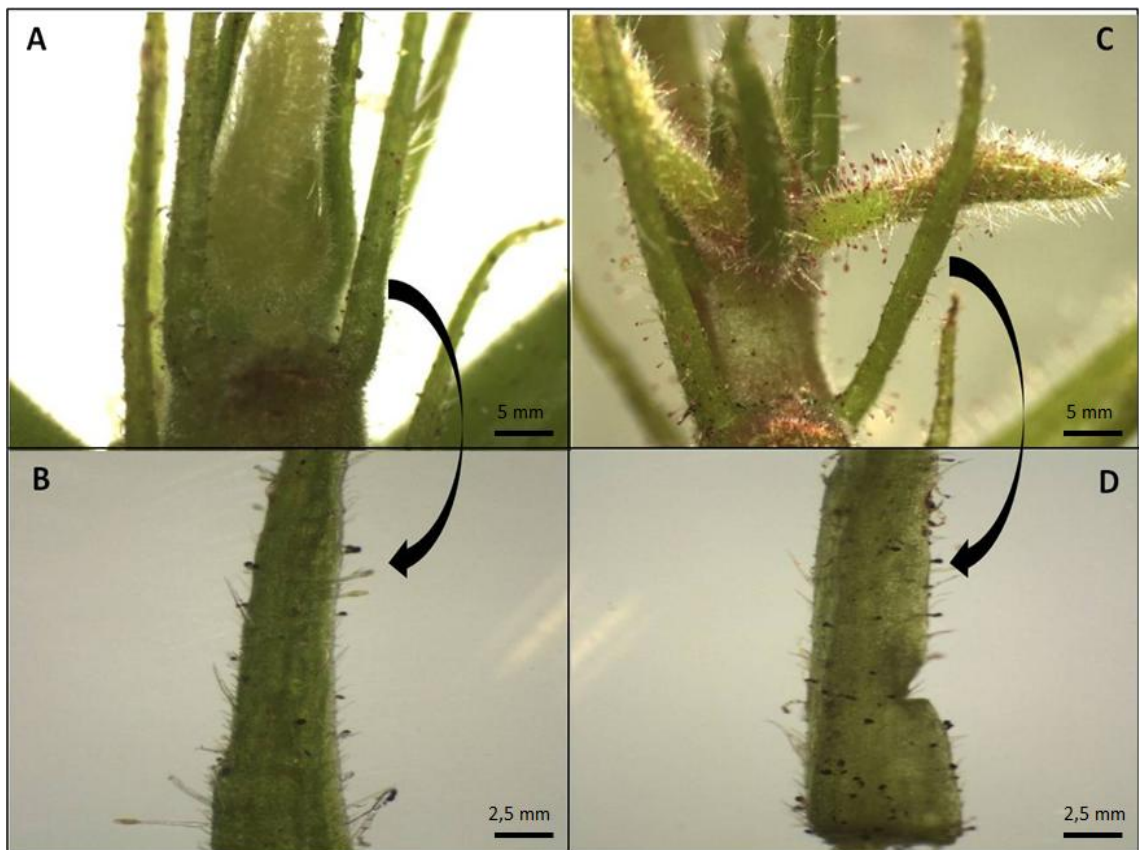
#### 4.4 Quantificação da densidade de tricomas glandulares curtos (SGTs) na folha

Nas folhas jovens das duas variedades contrastantes, suscetível (Catongo), e resistente (CCN51) a *M. perniciosa*, analisadas na lupa Leica EZ4D, foram identificados tricomas glandulares curtos (SGTs) e longos (TGTs) mostrados na figura 19. A densidade desses tricomas nas folhas de cacau em relação aos genótipos suscetível e resistente foi mensurada por contagem dos SGTs por cm<sup>2</sup>, em tecidos jovens, tanto do meristema (Figura 20) quanto em folhas jovens de 5 a 10 dias (Figura 21). A contagem dos folíolos do meristema do Catongo apresentou em média de aproximadamente 63 SGTs para cada planta (Tabela 3), enquanto que para a variedade CCN51 o meristema apresentou uma média de aproximadamente 176 SGTs. A variedade Catongo apresentou nas folhas jovens uma média de aproximadamente 700 SGTs/cm<sup>2</sup>, enquanto a variedade CCN51 apresentou uma média de aproximadamente 1600 SGTs/cm<sup>2</sup> (Tabela 4). As análises estatísticas pelo método do Teste T para duas amostras relacionadas apresentaram valores altamente significativos ( $p < 0,0001$ ), apresentando diferenças tanto para a contagem dos tricomas no meristema quanto nas folhas para as duas variedades de cacau testadas.

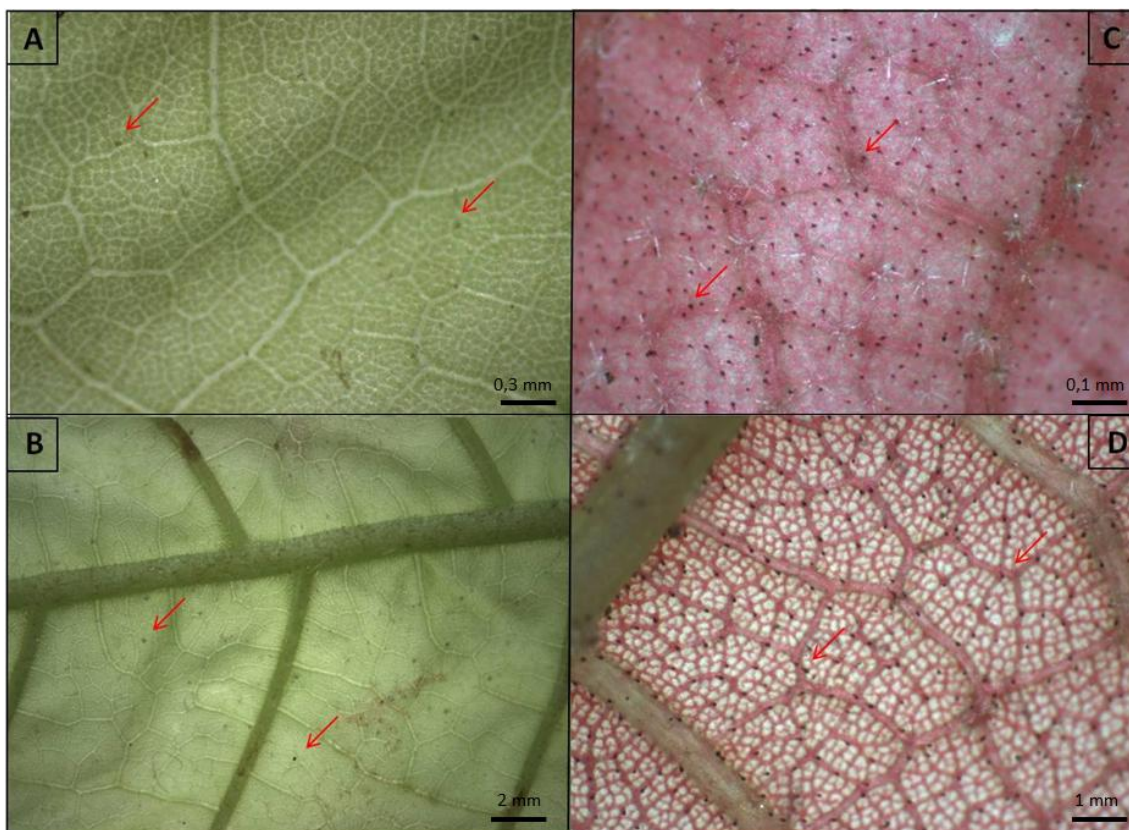




**Figura 19.** Identificação de tricomas SGTs em variedades contrastantes de cacau. Em A, imagem do filoplano de Catongo; Em B, imagem do filoplano de CCN51. Os tricomas glandulares curtos (SGTs) e longos (TGTs) estão indicados por seta.



**Figura 20.** Tricomas no ápice caulinar de cacau. Em A, ápice caulinar da variedade suscetível Catongo. Em B, Aumento de 15x dos folíolos do ápice caulinar de Catongo. C, Ápice caulinar da variedade resistente CCN51. Em D, Folíolos analisados a um aumento de 25x.



**Figura 21.** Quantidade de tricomas glandulares curtos em folhas jovens. A e B, superfície foliar adaxial e abaxial, respectivamente, da variedade Catongo. C e D, folha de CCN51 com sua superfície adaxial e abaxial, respectivamente. As setas apontam os tricomas glandulares curtos (SGTs).

**Tabela 3.** Contagem de tricomas nos meristemas das variedades Catongo e CCN51.

	MERISTEMA	CATONGO	CCN51
P L A N T A 1	FL 1	15	44
	FL 2	18	41
	FL 3	21	50
	FL 4	15	42
P L A N T A 2	FL 1	14	41
	FL 2	19	45
	FL 3	16	54
	FL 4	12	38
P L A N T A 3	FL 1	16	43
	FL 2	13	52
	FL 3	17	40
	FL 4	12	39
	-	Média: 62, 66	Média: 176, 33

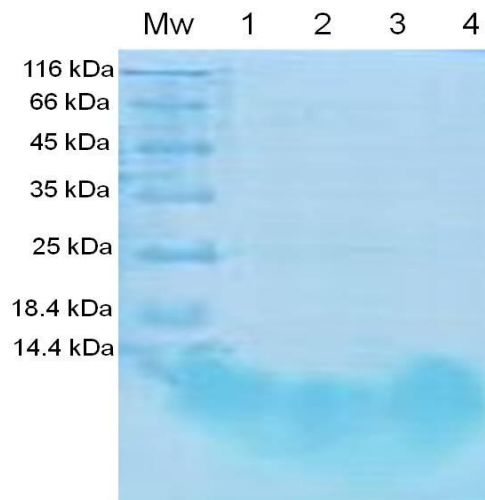
**Tabela 4.** Índice de tricomas por cm<sup>2</sup> nas folhas jovens das variedades Catongo e CCN51.

<b>FOLHA</b>	<b>CATONGO</b>	<b>CCN51</b>
F1	695	1595
F2	675	1567
F3	638	1578
F4	732	1642
F5	698	1653
F6	750	1552
-	<b>Média: 698,0</b>	<b>Média: 1597, 83</b>

#### **4.5 Perfil proteico do filoplano de cacau**

##### **4.5.1 Lavado foliar de Catongo no campo**

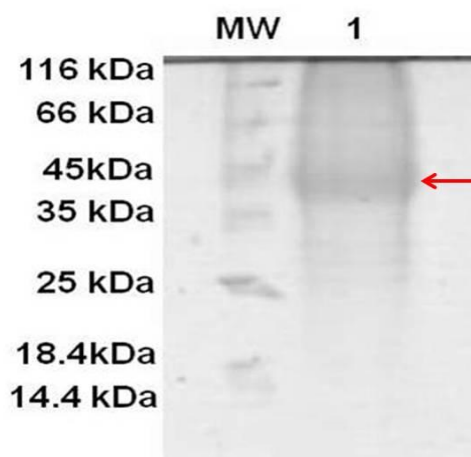
As folhas jovens de cacau da variedade Catongo foram coletadas do campo na Cabruca da UESC, sendo lavadas 60, 100 e 200 folhas na tentativa de encontrar uma quantidade suficiente para a extração, detecção e análise das proteínas. Conforme mostra a figura 22, não houve a separação das proteínas comumente observada, ou seja, com formação de bandas de proteínas no gel. Todavia, a mancha formada ao final do gel foi excisada para tripsinização das proteínas, e em seguida, as amostras foram aplicadas ao espectrômetro de massas. Entretanto, peptídeos não foram identificados depois da análise por MS/MS.



**Figura 22.** Perfil proteico da lavagem foliar de Catongo no campo. Mw, Marcador de proteínas (Fermentas); 1 a 4, Amostras de lavagens foliares de 60, 100, 200.

#### 4.5.2 Lavado foliar de CCN51 no campo

Para o experimento com o cacau resistente (CCN51), 600 folhas jovens desse genótipo foram coletadas no campo experimental da CEPLAC. A figura 23 mostra o fracionamento em gel SDS-PAGE 15 % de proteínas do lavado foliar de plantas de CCN51. A banda mais intensa do gel foi excisada, tripsinizada e analisada em espectrômetro de massas, resultando em oito peptídeos. A sequência aminoacídica da proteína foi encontrada a partir da busca em banco de dados de *T. cacao* L. (Figura 24).



**Figura 23.** Fracionamento em gel SDS-PAGE 15% de proteínas do lavado foliar de *T. cacao* L. (CCN51). Mw, Marcador de proteínas (Fermentas). 1, Extrato de proteínas do lavado realizado na superfície foliar de plantas do campo. A banda apontada com a seta foi excisada do gel e analisada pelo MS/MS.

**Sequência da proteína encontrada na análise do Massas**  
(CGD0003061)

MASRSCLFAFLLFLAFQSTRVKGQSLPPQCRQVPGTSAQLMQVALNMEVLRTELFLRASIGRGL  
NDLAPNLIQGPAPIGARIANLDNVTRRIIEELGYQGIGNRILGNRLVTPIQGPQLNSRQAFSNFM  
NSALNTLSPPFDPYVNTTSFLVASTFIPTAIQYYLGLPDLANIDLRVLGASLLAIESARYGVLR  
TQLYLRLVNAIVPPYRFTVANLTERIAQLTNRLGMCQKDEGLVVPLALGAENRTTSNIIAANVN  
SLLLPRITILEVFRIFFGTGNASMTGGFFPNGMNGAIAENIIRRLV

m/z	Charge	Peak mW	Peptide mW	Delta (Da)	Start	End	Sequence	Modifications
729.0583	3	2184.151	2184.14	0.011719	33	52	(R)QVPGTSAQLMQVALNMEVLR(T)	
734.3936	3	2200.158	2200.135	0.022949	33	52	(R)QVPGTSAQLMQVALNMEVLR(T)	Oxidation M (16)
1101.079	2	2200.142	2200.135	0.007324	33	52	(R)QVPGTSAQLMQVALNMEVLR(T)	Oxidation M (10)
619.351	3	1855.03	1855.031	-0.00183	64	82	(R)GLNDLAPNLIQGPAPIGAR(I)	
508.2758	2	1014.536	1014.546	-0.00977	83	91	(R)IANLDNVTR(R)	
525.6288	3	1573.863	1573.846	0.016479	93	106	(R)IEELGYQGIGNR(A)	
787.9143	2	1573.813	1573.846	-0.03345	93	106	(R)IEELGYQGIGNR(A)	
322.1977	2	642.3798	642.3813	-0.00153	107	112	(R)AILGNR(L)	
650.3875	2	1298.759	1298.756	0.003784	183	195	(R)VLGASLLAIESAR(Y)	
650.3801	2	1298.745	1298.756	-0.01099	183	195	(R)VLGASLLAIESAR(Y)	
397.2294	2	792.4432	792.4494	-0.00623	201	206	(R)ITQLYLRL(V)	
899.0143	2	1796.013	1796.016	-0.00256	254	270	(R)ITTSNIIAANVNSLLLPR(T)	
899.0102	2	1796.005	1796.016	-0.01074	254	270	(R)ITTSNIIAANVNSLLLPR(T)	

**Figura 24.** Peptídeos identificados pelo MS/MS, mostrando sequência aminoácida da proteína identificada no banco de dados genômicos do *T. cacao* L.

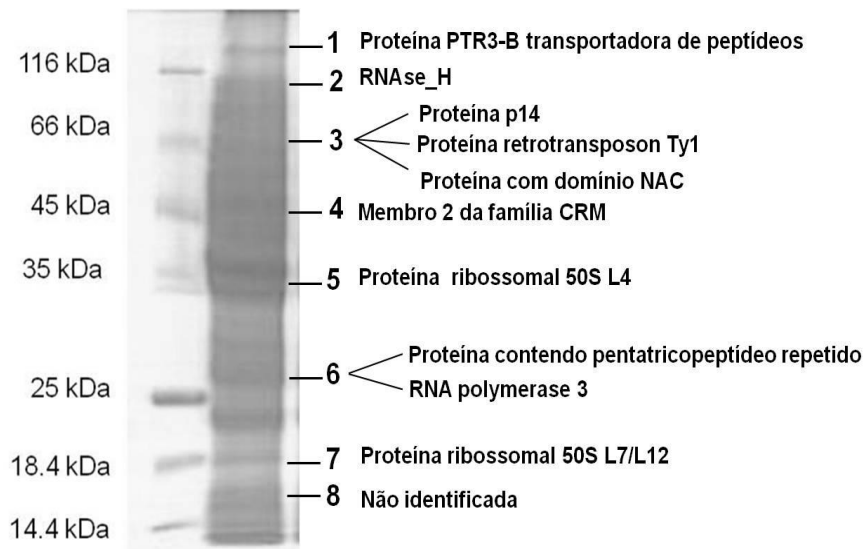
A sequência aminoácida identificada pelo programa ProteinLynx associado ao MS/MS foi submetida a uma busca por Blastp, buscando similaridade às proteínas no banco de dados do NCBI. O resultado do BLASTP mostra uma nova proteína básica relacionada à dessecação descrita em *Medicago trunculata* e preditas em plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Glycine max*, *Vitis vinifera*, entre outras (Figura 25). A proteína de dessecação do *T. cacao* possui uma massa molecular de 33.7 kDa, correspondendo a 310 aminoácidos e um ponto isoelétrico teórico de 10.25, preditos pelo programa ProtParam.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">XP_002531875.1</a>	conserved hypothetical protein [Ricinus communis] >gb EEF30512.1	248	248	97%
<a href="#">XP_002300440.1</a>	predicted protein [Populus trichocarpa] >gb EEE85245.1  predicted p	238	238	89%
<a href="#">XP_002878474.1</a>	hypothetical protein ARALYDRAFT_907848 [Arabidopsis lyrata subsp.	236	236	96%
<a href="#">XP_002531874.1</a>	conserved hypothetical protein [Ricinus communis] >gb EEF30511.1	233	233	99%
<a href="#">NP_191832.1</a>	uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana] >gb AAK95319.1 AF41	230	230	96%
<a href="#">NP_564518.1</a>	uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana] >gb AEE32234.1  uncl	226	226	97%
<a href="#">AAM55140.1</a>	desiccation-related protein, putative [Arabidopsis thaliana]	225	225	97%
<a href="#">XP_002894087.1</a>	hypothetical protein ARALYDRAFT_891606 [Arabidopsis lyrata subsp.	223	223	97%
<a href="#">NP_001142402.1</a>	uncharacterized protein LOC100274577 precursor [Zea mays] >gb AC	223	223	85%
<a href="#">XP_003546306.1</a>	PREDICTED: desiccation-related protein PCC13-62-like [Glycine max]	221	221	87%
<a href="#">AAG51530.1</a>	desiccation-related protein, putative; 70055-71849 [Arabidopsis thali	220	220	95%
<a href="#">XP_002283317.1</a>	PREDICTED: desiccation-related protein PCC13-62-like isoform 1 [Viti	219	219	95%
<a href="#">CB120807.3</a>	unnamed protein product [Vitis vinifera]	219	219	90%
<a href="#">XP_002267051.1</a>	PREDICTED: desiccation-related protein PCC13-62 [Vitis vinifera] >en	219	219	97%
<a href="#">XP_001760386.1</a>	predicted protein [Physcomitrella patens subsp. patens] >gb EDQ747	197	197	91%
<a href="#">XP_003594696.1</a>	Desiccation-related protein PCC13-62 [Medicago truncatula] >gb ABF	197	197	85%
<a href="#">NP_001150304.1</a>	LOC100283934 precursor [Zea mays] >gb ACG38589.1  desiccation-i	195	195	89%
<a href="#">NP_001149373.1</a>	desiccation-related protein PCC13-62 precursor [Zea mays] >gb ACF	194	194	89%
<a href="#">BAK05090.1</a>	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	191	191	96%
<a href="#">XP_002440607.1</a>	hypothetical protein SORBIDRAFT_09g003940 [Sorghum bicolor] >gb	191	191	89%
<a href="#">XP_003528608.1</a>	PREDICTED: desiccation-related protein PCC13-62-like [Glycine max]	190	190	88%
<a href="#">XP_002447781.1</a>	hypothetical protein SORBIDRAFT_06g015170 [Sorghum bicolor] >gb	186	186	87%
<a href="#">XP_003528610.1</a>	PREDICTED: desiccation-related protein PCC13-62-like [Glycine max]	185	185	84%
<a href="#">XP_003542184.1</a>	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: desiccation-related protein PCC	185	185	95%
<a href="#">XP_002865677.1</a>	hypothetical protein SELMODRAFT_143620 [Selaginella moellendorffii]	184	184	96%
<a href="#">XP_003594693.1</a>	Desiccation-related protein PCC13-62 [Medicago truncatula] >gb ABF	184	184	95%
<a href="#">XP_003579663.1</a>	PREDICTED: desiccation-related protein PCC13-62-like [Brachypodium	184	184	87%

**Figura 25.** Resultado do Blastp com busca em banco de dados não redundantes do NCBI. A sequência identificada por MS/MS da amostra do lavado foliar de CCN51 do campo apresentou similaridade com proteínas relacionadas à dessecação de outras plantas (ver destaques em vermelho).

Sementes de CCN51 foram germinadas e plantadas em casa de vegetação, sendo somente o solo irrigado. Quando as folhas atingiram uma idade média de 5 a 10 dias, um total de 1200 folhas foram coletadas e lavadas. O extrato proteico depois de liofilizado foi separado em três frações e ressuspensionado com água, tampão de amostra e tampão de reidratação. Das duas primeiras frações analisadas em gel SDS-PAGE 15 %, foram excisadas oito bandas do gel para digestão trípica e identificação de proteínas pelo espectrômetro de massas (Figura 26). As bandas da amostra ressuspensionada em água ficaram pouco visíveis (dado não mostrado). A fração ressuspensionada em tampão de reidratação foi analisada em gel 2D.



**Figura 26.** Perfil proteico do lavado foliar da variedade de cacau CCN51. Proteínas isoladas do lavado foliar foram fracionadas por eletroforese em gel SDS-PAGE e coradas com azul de comassie coloidal. A identidade das bandas de 1-8 (por ESI-MS/MS) é mostrada no lado direito da imagem. Mw corresponde ao marcador de massa molecular de proteínas, cujos valores de massas em kDa estão indicados à esquerda.

A tabela 5 mostra a lista de proteínas identificadas a partir da análise proteômica do filoplano do cacau. De um total de 10 proteínas identificadas de oito bandas excisadas do gel, oito apresentaram identidade com proteínas de plantas e, em sua maioria, são relacionadas ao metabolismo de ácidos nucléicos e sua regulação. Duas bandas apresentaram identidade com proteínas ribossomais de bactérias.

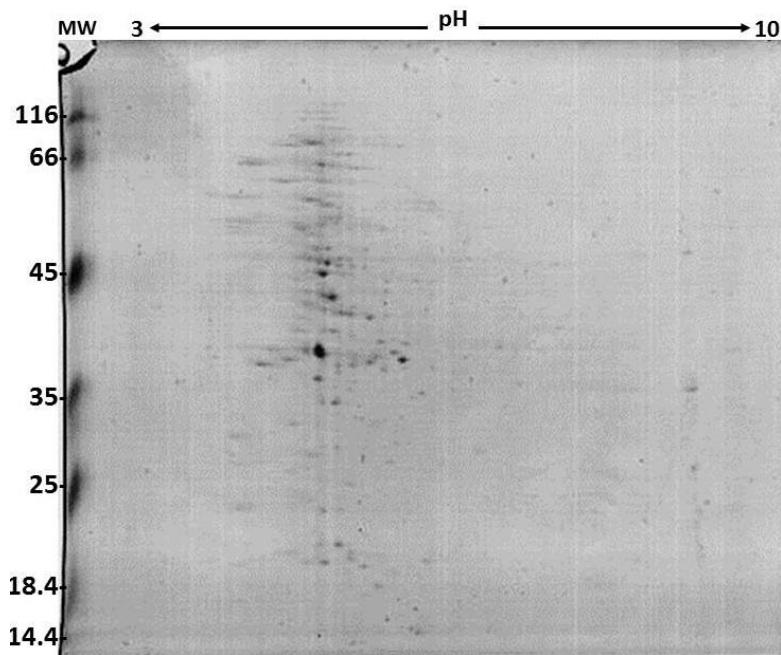
**Tabela 5.** Identificação de proteínas por MS/MS do lavado foliar de cacau em gel SDS-PAGE 15%.

Nº	Peptídeo	Proteína e organismo*	Função
1	<u>LQQRIR</u>	Proteína PTR3-B transportador de peptídeo (Medicago truncatula)	Transporte de peptídeos
2	<u>SIGIGDSNLAEVKA</u>	RNAse_H (Arabidopsis thaliana)	Degrada RNA do híbrido RNA:DNA
3	<u>TGSKWVVVK</u>	Proteína p14 (Ricinus communis)	Auxilia no Splicing do pré-RNA <sub>m</sub>
3.1	<u>SILDTNK</u>	Proteína retrotransposon Ty1 (Oryza sativa)	Liga-se ao DNA. relacionada à resistência a doenças em plantas.
3.2	<u>TNWIMHEYRLADNK</u>	Proteína com domínio NAC (Ricinus communis)	Fator de transcrição
4	<u>LHILNLTR</u>	Membro 2 da família CRM (Arabidopsis thaliana)	Splicing de RNA e maturação do ribossomo
5	<u>EFNEALVHQVVTAYLAGGR</u>	Proteína ribossomal 50S L4 (Acinetobacter sp.)	Repressora da transcrição e/ou tradução
6	<u>LDEAYRLAK</u>	Proteína contendo pentatricopeptídeo repetido (Arabidopsis thaliana)	Função desconhecida, podendo estar envolvido na estabilização e processamento do RNA
6.1	<u>LLIDQVDRK</u>	RNA polymerase 3 (Arabidopsis thaliana)	Sintetiza pequenos rRNA e tRNA do complexo enzimático responsável pela transcrição do DNA em RNA.
7	<u>DLVEGAPQVLK</u>	Proteína ribossomal 50S L7/L12 (Acinetobacter sp.)	Ribonucleoproteína envolvida na tradução de proteínas
8	Não identificada	-	-

\* O organismo para o qual a proteína foi descrita como está indicado entre parênteses na coluna 3 da tabela.

A terceira porção da amostra ressuspensa em tampão de reidratação foi analisada em gel bidimensional, usando na primeira dimensão tiras de gel de 13 cm com gradiente de pH de 3 a 10 e na segunda dimensão, SDS-PAGE 12,5%. O perfil proteico da amostra é mostrado na figura 27. A maioria dos spots indica a predominância de proteínas neutras a ácidas no lavado foliar. Um total de 71 spots foram excisados do gel, processados e analisados por espectrometria de massas e os resultados são mostrados nas tabelas 6 e 7.





**Figura 27.** Perfil em Gel 2-D de proteínas do lavado foliar do *T. cacao*. As proteínas foram extraídas da superfície das folhas de cacau da variedade CCN51, separadas por IEF utilizando tiras de 13 cm e pH variando de 3-10 que, em seguida foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5%. MW, corresponde ao padrão de massa molecular em kDa.

Dos 71 spots excisados no gel 2D e analisados por MS/MS, foram identificados 23 diferentes proteínas de plantas (Tabela 6) e 11 proteínas de bactérias (Tabela 7). Nas tabelas são mostradas a nomenclatura das proteínas, os organismos com maior similaridade, a massa molecular (Mw) e o ponto isoelétrico (pI) e suas respectivas funções. Ao considerar análises do gel SDS-PAGE 1D e 2D foi identificado um total de 28 proteínas de plantas (42.4%) e 13 proteínas de bactérias (19.7%). (Figura 28).

**Tabela 6.** Lista de proteínas do lavado foliar de cacau, cujos peptídeos gerados por MS/MS apresentaram identidade com proteínas de plantas. Os peptídeos foram gerados a partir de spots excisados do gel mostrado na figura 29.

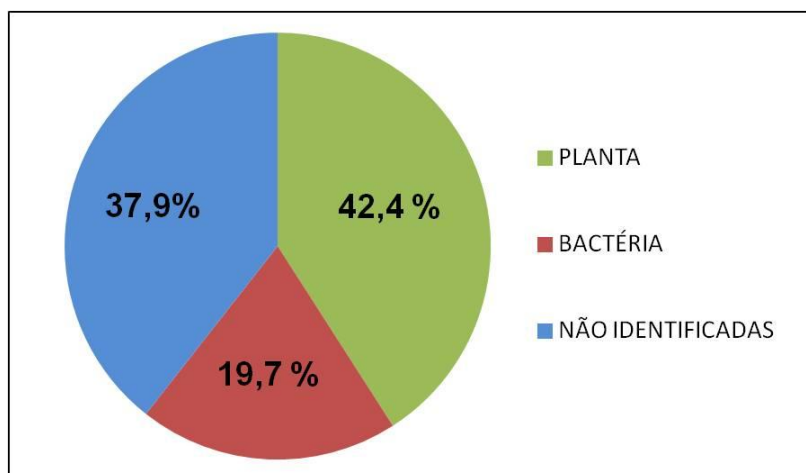
Proteína e organismo*	Mw (kDa)	pI	Função
RNAse_H (ribonuclease) (Populus trichocarpa)	40.56	8.21	Cliva o RNA no híbrido RNA:DNA
Sintase do $\beta$ -cariofileno (Vitis vinifera)	42.54	6.04	Biossíntese de isoprenóides (Defesa da planta)
Lacase 11 (Arabidopsis thaliana)	58.30	9.63	Oxidoredutase, processo de síntese da lignina.
Transcetolase cloroplastídica (Arabidopsis thaliana)	80.60	6.34	Participam do ciclo de Calvin na fotossíntese (Energia)
Receptor de kinase com domínio leucina (Arabidopsis thaliana)	74.38	5.84	Transdução de sinais; Via de sinalização (receptor) na defesa da planta contra patógenos (Defesa da planta)
E3 Ubiquitina ligase PUB14 (Populus trichocarpa)	39.70	7.58	Proteínas relacionadas à interação planta-patógeno
Retrotransposon/ provável poliproteína (Oryza sativa japonica)	20.76	10.41	Liga-se a ácidos nucleicos. Resistência a doenças em plantas (Defesa da planta)
Proteína similar a Feroforina (Arabidopsis thaliana)	49.22	9.77	Glicoproteína da matriz extracelular (Estrutura celular)
Proteína contendo domínio $\alpha/\beta$ -hidrolase (Arabidopsis thaliana)	57.50	6.83	Participam de funções catalíticas com o metabolismo de lipídeos (Metabolismo)
Fator IIS do alongamento da transcrição (Arabidopsis thaliana)	50.14	9.21	Eficiente formação e/ou estabilidade do complexo com a RNA polimerase II. (Transcrição)
Proteína da família S28 de serine carboxipeptidase (Arabidopsis lyrata)			Degradação de proteínas – Protease (Defesa da planta)
Terpene ciclase, proteína contendo domínio C1 (Arabidopsis thaliana)	42.54	6.04	Biossíntese de isoprenóides (Defesa da planta)
Endonuclease/exonuclease/ fosfatase (Arabidopsis thaliana)	12.59	6.06	Reparo de DNA
RNA metiltransferase (Arabidopsis thaliana)	63.40	8.76	Processamento de RNAs (Transcrição)
Fosfatidilcolina-esterol O-aciltransferase (Arabidopsis thaliana)	78.96	6.01	Metabolismo de lipídeos, esteroides, importantes no processo de senescência da folha
Proteína REM16 com o domínio B3 (Arabidopsis thaliana)	44.59	8.8	Envolvida na regulação da transcrição (Transcrição)
Proteína da família armadilo/beta- catenina repetida (Arabidopsis thaliana)	72.55	6.76	Transdução de sinais em respostas hormonais
Proteína da família Rad4 de reparo de DNA (Arabidopsis thaliana)	78.72	6.35	Participam no reparo DNA danificado por excisão de nucleotídeos
Glicoprotease 1 (Arabidopsis thaliana)	49.57	9.23	Protease
Proteína hipotética	12.60	4.62	Desconhecida
O-Glicosil hidrolases (Arabidopsis thaliana)	46.38	6.45	Metabolismo de carboidratos (Metabolismo)
Proteína 10 do tipo Romboide- (Arabidopsis thaliana)	38.54	10.47	Atividade endoproteínase tipo serina - Serina protease

\* O organismo para o qual a proteína foi descrita como está indicado entre parênteses na coluna 1 da tabela.

**Tabela 7.** Peptídeos do lavador foliar de cacau que apresentaram identidade com proteínas de bactérias. Os peptídeos foram gerados a partir de spots excisados do gel apresentado na figura 19.

Proteína e organismo*	Mw (kDa)	pI	Função
Fator de alongação G ( <i>Acinetobacter baumannii</i> )	79.13	5.04	Translocação do ribossomo durante a tradução (tradução)
Chaperonina 60kDa ( <i>Acinetobacter</i> sp.)	59.95	4.88	Dobramento de proteínas (defesa da planta)
ATP synthase subunidade $\alpha$ <i>Acinetobacter baumannii</i> )	55.53	5.29	Regulação na síntese de ATP (energia)
Fator de alongação Tu ( <i>Acinetobacter</i> sp.)	43.21	5.20	Liga o tRNA ao ribossomo (tradução)
Fator de alongação Ts ( <i>Acinetobacter</i> sp.)	30.97	5.15	Fosforilação de GDP para GTP (tradução)
Polyribonucleotide nucleotidyltransferase ( <i>Acinetobacter</i> sp.)	75.06	5.07	Processamento de mRNA
Outer membrane protein- Omp 38 ( <i>Acinetobacter baumannii</i> )	38.41	5.32	Difusão de pequenos metabólitos (estrutura celular)
Phosphate-binding protein pstS ( <i>Escherichia coli.</i> )	37.02	8.39	Transporte de fosfato e resposta ao estresse (defesa da planta)
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit ( <i>Acinetobacter</i> sp.)	22.67	5.29	Degradação de proteínas (defesa da planta)
ATP synthase subunit beta ( <i>Pseudomonas putida</i> )	49,38	4.89	(energia)

\* O organismo para o qual a proteína foi descrita como está indicado entre parênteses na coluna 1 da tabela.



**Figura 28.** Distribuição percentual com relação ao organismo de origem das proteínas identificadas por MS/MS a partir de spots de gel 2D do lavado foliar de *T. cacao* variedade CCN51. Foram identificadas 28 proteínas de plantas, 13 de bactérias.

#### 4.6 Análise dos sintomas causados pelo *M. pernicioso*

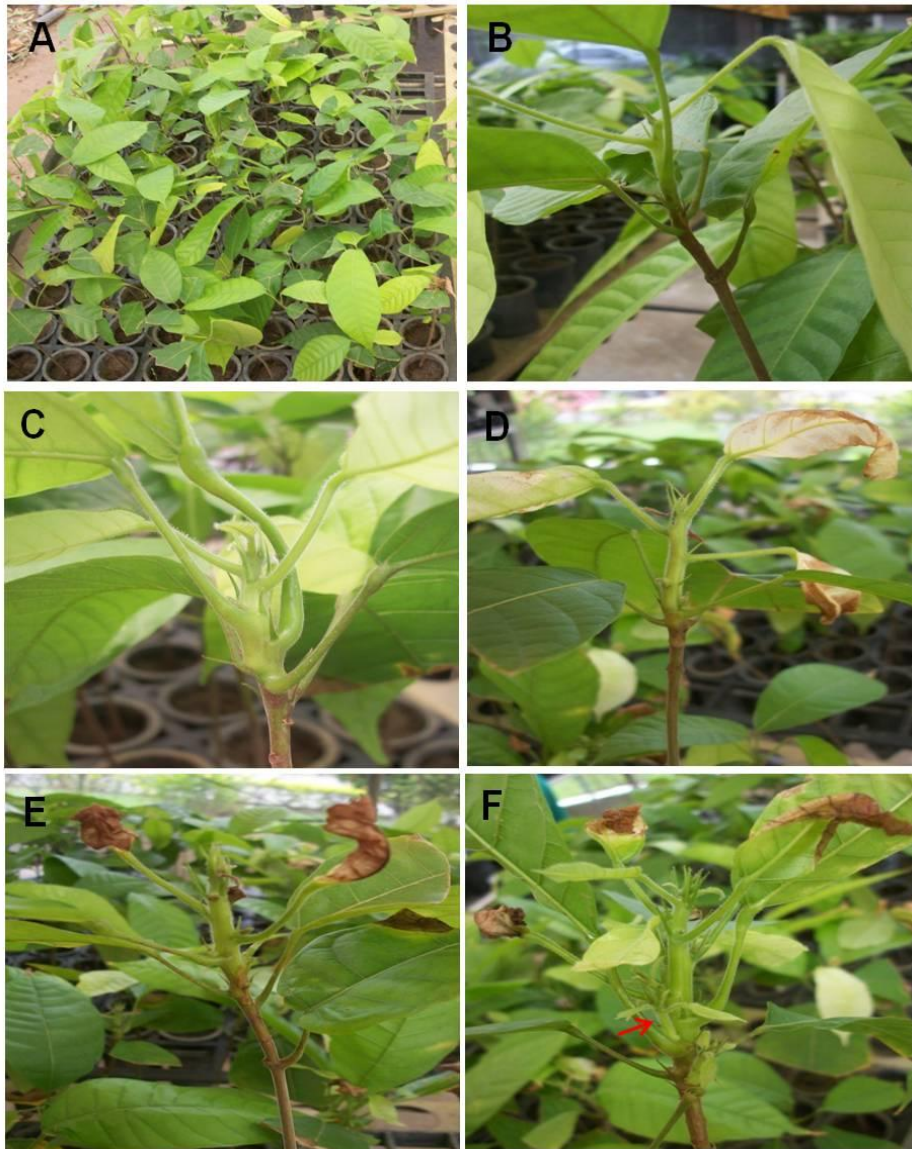
Com a finalidade de verificar o papel de componentes hidrossolúveis do filoplano do cacau, plantas da variedade suscetível Catongo e da variedade resistente CCN51 irrigadas por aspersão ou irrigadas somente no solo foram inoculadas com suspensão de basidiósporos de *M. pernicioso* e avaliadas quanto à presença de sintomas da vassoura nos tempos 15, 20, 25, 30 e 45 dias após a inoculação (Tabela 8).

Os primeiros sintomas apareceram nas plantas de Catongo irrigadas por aspersão aos 15 dias após a inoculação com um total de 11 plantas apresentando hipertrofia dos tecidos. Nas plantas resistentes (CCN51) irrigadas somente no solo não foram detectados sintomas da doença aos 15 dias após inoculação. Nessas plantas só ocorreu sintomas da doença a partir dos 25 dias após inoculação, sendo apresentadas somente quatro plantas com sintomas de um total de 75 plantas nesse tratamento. O percentual de infecção da doença apresentado entre as duas variedades nos dois tratamentos foram os seguintes: 66,7% das plantas de Catongo e 32% das plantas de CCN51 foram infectadas pelo fungo com as plantas sendo molhadas completamente, todavia, 36% de Catongo e 9,3% de CCN51 haviam sido infectadas molhando somente o solo. As plantas testemunhas sem a inoculação do fungo não apresentaram sintomas da doença.

**Tabela 8.** Número de plantas das variedades de cacau Catongo e CCN51 apresentando sintomas da vassoura-de-bruxa após inoculação do fungo *M. pernicioso*.

Variedade de cacau	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias	45 dias
Catongo (T1)	11	26	48	50	50
CCN51 (T1)	-	9	22	23	24
Catongo (T2)	-	9	23	25	27
CCN51 (T2)	-	-	4	5	7

Os sintomas observados durante os diferentes tempos de avaliação do experimento até aos 45 dias após inoculação são mostrados na figura 29. A presença de vassoura terminal é mostrada com engrossamento do caule (Figura 29, C a F), do pecíolo e do pulvino (Figura 29C), folíolos murchos e necrosados (Figura 29, D a F), além da presença de vassouras axilares (Figura 29F), com algumas medindo mais de 1 cm.



**Figura 29.** Plantas de *T. cacao* infectadas com o fungo da vassoura-de-bruxa. A, panorama geral das plantas inoculadas, sob condições da casa de vegetação CEPEC-CEPLAC; B, plantas controle não inoculadas; C, plantas com sintomas de engrossamento do caule, do pecíolo e do pulvino após 15 e 20 dias; D, plantas apresentando folíolos murchos e início da necrose com 25 dias; E, plantas apresentando dentre outros sintomas, vassouras axilares maiores que 1cm, indicado pela seta.

#### 4.7 Análises estatísticas da incidência e severidade da doença

Nas análises de variância (ANOVA) foram considerados o número de plantas que apresentaram sintomas da doença (SINT) e o número total de plantas com vassoura (Vtot). Os valores encontrados foram altamente significativos ( $p < 0,001$ ), apresentando diferenças em todas as variáveis testadas para os tratamentos com plantas irrigadas por aspersão (T1) e plantas irrigadas somente no solo (T2), como também para os genótipos utilizados. Na análise por tratamento, a variável SINT relacionada à incidência da doença variou de 21,9 % para planta irrigadas somente no solo (T2) a 49,3 % para plantas irrigadas por aspersão (T1). Para a variável Vtot a frequência de plantas com vassoura variou de 7,9 para plantas irrigadas somente no solo (T2) a 19,4 % para plantas irrigadas por aspersão (T1). Ou seja, as diferenças foram significativas entre os dois tratamentos em estudo.

**Tabela 99.** Porcentagens médias de incidência de vassoura-de-bruxa (SINT), de agressividade da vassoura-de-bruxa (Vtot) apresentados pelas plântulas de progênies de cacauero variedade Catongo e CCN51 submetidas aos tratamentos de irrigação por aspersão (T1) e irrigação somente no solo (T2), seguido de inoculação com *M. perniciosa*.

Tratamento	SINT (%)	Vtot
T1	49,3 A	19,4 A
T2	21,9 B	7,9 B

Na análise por genótipo, a variável SINT relacionada com a incidência à doença variou de 19 % (CCN51) a 52 % (catongo) e para a variável Vtot, a frequência de plantas com vassoura variou de 6,52 (CCN51) a 20,8 (catongo) separando os genótipos em dois grupos distintos para suscetibilidade. De modo geral, considerando os resultados obtidos, pode-se observar que a incidência e severidade da doença foram maiores nas plantas irrigadas por

aspersão (T1) do que nas plantas irrigadas somente no solo (T2), assim como foram maiores em Catongo do que em CCN51, comportamento observado nos dois tratamentos, apresentando dessa forma, diferenças entre tratamento e entre genótipos.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação, clonagem e expressão do gene da filoplanina do *T. cacao*.

Diante dos prejuízos sócio-econômicos acarretados pela vassoura-de-bruxa muitos estudos vem sendo desenvolvidos, buscando métodos de manejo e combate à doença. A disponibilização do genoma do cacau tem sido muito importante em diversas pesquisas relacionadas ao patossistema *M.perniciosa-T. cacao*. Uma proteína denominada filoplanina encontrada primeiramente em tabaco (*Nicotiana tabacum*) é secretada para a superfície foliar e exibe elevada atividade inibitória sobre diferentes patógenos, já existindo patente registrada para uso dessa proteína (SHEPHERD et al., 2005).

Uma sequência similar foi identificada em cacau no banco de EST's do CIRAD <http://ESTtik.cirad.fr/> (ARGOUT et al., 2008) utilizando a proteína T-Phylloplanin. A sequência encontrada no banco EST *tik* apresentava uma ORF aparentemente completa que, posteriormente, foi confirmada a presença de um falso códon iniciador. A constatação de que a sequência do CIRAD estava incompleta foi possível com a publicação do genoma do cacau pela MARS, comparando assim o DNA genômico com o cDNA do banco EST *tik* obtido no CIRAD. Assim, a sequência utilizada na primeira estratégia de clonagem faltava 153 nucleotídeos na região N-terminal em relação à sequência obtida no banco de dados genômicos da MARS.

Assim, pela primeira vez foi confirmada a presença de um gene em cacau para filoplanina e foi possível também a sua identificação completa desde a região 5`UTR até a 3`UTR, conforme a similaridade de sequência de 72 % com a T-Filoplanina caracterizada em tabaco. A identificação do gene da filoplanina no banco genoma do cacau, e a identificação do cDNA na biblioteca de ESTs confirma que o gene é transcrito na planta.



A fim de produzir a proteína filoplanina para realização de ensaios bioquímicos e funcionais, o cDNA foi clonado no vetor pET28a e a estirpe de *E. coli* Rosetta (*DE<sub>3</sub>*) foi utilizada, visando à expressão. Todas as etapas da clonagem foram realizadas com sucesso, tanto para o cDNA incompleto obtido do banco do CIRAD (Figura 4) quanto para a sequência completa (Figura 8), cujos primers foram desenhados a partir do clone genômico. Contudo, a proteína recombinante não foi detectada nos extratos de *E. coli* induzidos com IPTG tanto para a versão incompleta (Figura 17), quanto para a versão completa (Figura 18).

Uma vez que a filoplanina pode apresentar atividade anti-microbiana (SHEPHERD et al., 2005) a proteína recombinante pode ter apresentado toxicidade para as células de *E. coli* afetando a expressão e impedindo o seu acúmulo (SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2008). Outros fatores podem também prejudicar a expressão de proteínas, como por exemplo, o tamanho relativamente pequeno da filoplanina, o que não confere uma boa estabilidade em sistema heterólogo. Contudo, a versão incompleta da proteína com massa predita de 10 kDa está mais sujeita a esse problema de instabilidade do que a versão completa que apresenta uma massa predita de aproximadamente 16 kDa.

Além disso, as bactérias não possuem um sistema de endo-membranas para promover as modificações pós-traducionais que ocorrem no sistema eucariótico para tornar as proteínas maduras, o que compromete a estabilidade de muitas proteínas eucarióticas quando expressas em *E. coli*. Outra possibilidade é a ocorrência de estruturas secundárias no mRNA transcrito a partir do vetor recombinante, que podem bloquear a tradução do códon iniciador e comprometer completamente a tradução do mRNA (TESSIER et al., 1984; LOOMAN et al., 1986).

Muitas vezes as proteínas não acumulam no meio de cultura, mas nenhuma causa concreta é identificada. Nesses casos, a mudança do vetor de expressão e, ou da estirpe de bactéria hospedeira pode constituir em alternativa de expressão, visando à produção da proteína. Nesse sentido, é indicado o uso de uma proteína de fusão maior, como por exemplo, a tiorredoxina ou o domínio de ligação à quitina da quitinase, para tornar a

proteína mais estável e evitar sua possível degradação por proteases bacterianas.

## **5.2 Identificação de proteínas em gel 1D e 2D**

Tendo em vista a existência de um gene no cacau homólogo à T-filoplanina do tabaco, uma abordagem proteômica foi estabelecida a fim de identificar a filoplanina, bem como outras possíveis proteínas presentes no filoplano do cacau, a partir de lavado aquoso de folhas. As pesquisas realizadas para descobertas de proteínas e peptídeos antimicrobianos na superfície dos animais, envolvidos em mecanismos de defesa já são bem documentados, enquanto há poucos relatos dessa função em plantas. Sendo assim, não há relatos na literatura de estudos com proteínas no filoplano das folhas de cacau, sendo que nesse trabalho foram identificadas inúmeras proteínas de plantas e bactérias. Possivelmente, essas proteínas podem estar envolvidas em estratégias de adaptação, crescimento e na imunidade inata da planta, atuando como linha de frente no combate à invasão microbiana, seja com funções diretas ou podendo exibir atividades que estimulam e modulam o sistema de defesa na superfície foliar (SHEPHERD et al., 2005; SHEPHERD; WAGNER, 2007).

Muitos trabalhos têm dado enfoque aos metabólitos secundários secretados em exsudados de células especializadas da epiderme, os tricomas, presentes em diversas plantas vasculares, enquanto as proteínas do filoplano são pouco estudadas. Esses metabólitos participam da barreira de defesa constitutiva ou induzida de estresses bióticos e abióticos (LAI; GALLO, 2008; HARADA et al., 2010).

Neste trabalho, as proteínas sintase do  $\beta$ -cariofileno e ciclase do terpeno foram identificadas na superfície foliar do cacau. Essas duas enzimas, provavelmente, produzidas em tricomas glandulares, fazem parte da rota de biossíntese de metabólitos secundários do tipo isoprenoides que são importantes na defesa de plantas (CHAPPELL, 1995; KÖLLNER et al., 2008).

As glicoproteínas feroforinas também foram detectadas na superfície foliar do cacau, portanto, podem ser produzidas e secretadas pelos tricomas, mas foram identificadas participando da estrutura das células (HARADA et al., 2010).

Outras proteínas identificadas estão possivelmente envolvidas em mecanismos de defesa da planta como E3 ubiquitina ligase PUB14 e kinase que segundo Gesteira et al. (2007) são proteínas relacionadas à interação planta-patógeno. Tais proteínas podem participar da defesa constitutiva, uma vez que estas foram detectadas em plantas não infectadas, ou seja, estão presentes na planta antes do ataque de agentes patogênicos, e podem ter seus níveis de expressão aumentados caso a planta venha sofrer estresses bióticos ou abióticos .

A proteína kinase atua como receptor na via de sinalização da superfície celular, reconhecendo sinais do meio externo (e interno) como, por exemplo, dos elicitores de fitopatógenos, transmitindo esses sinais e desencadeando eventos como biossíntese de compostos de defesa na planta. Além de estar envolvida na resposta e resistência a agentes patogênicos. Estudos demonstraram a participação das kinases no crescimento celular, respostas a hormônios e estresse osmótico em plantas (INÁCIO et al., 2002; LABANCA, 2002).

A proteína retrotransposon (poliproteína) também identificada no filoplano se liga a ácidos nucleicos, possivelmente contribuindo para a variabilidade genética, conferindo uma maior resistência da planta a doenças (KUMAR; BENNETZEN, 1999). Outra proteína detectada nesse estudo envolvida na defesa da planta contra estresse abiótico foi a proteína de tolerância a dessecação/seca. Diversos estudos demonstram a presença dessa proteína em grão de pólen com participação no desenvolvimento e defesa contra estresse abiótico (WANG et al., 1998).

Outras proteínas identificadas no filoplano foram as enzimas proteolíticas que desempenham papéis importantes em diversos processos do desenvolvimento, fisiologia vegetal e na defesa, sendo importantes na degradação de proteínas danificadas e potencialmente prejudiciais à planta. Além disso, são responsáveis por modificações pós-traducionais, como por

exemplo, clivam sítios específicos para maturação e ativação de diversas enzimas (SCHALLER, 2004). Dentre essa classe de enzimas foram identificadas as glicoprotease 1, uma proteína da família serina carboxipeptidase S28 e a proteína 10 similar à romboide.

A enzima RNase H também foi identificada em abundância no filopiano e sua função é conhecida na degradação de RNA do híbrido RNA:DNA de diversos organismos (PILEUR; TOULME; CAZENAVE, 2000).

Sabe-se que a transcrição é um dos processos celulares mais importantes em que a informação do DNA é transmitida à molécula de RNA. A partir da transcrição são sintetizados todos os tipos de RNAs que terão posteriormente envolvimento na síntese proteica. Esse processo é subdividido em três etapas principais, a iniciação, o alongamento e a terminação, e é principalmente na iniciação da transcrição que ocorre o controle da expressão gênica, na qual muitas proteínas reguladoras, chamadas de fatores de transcrição estão envolvidas, seja ativando ou reprimindo a transcrição (DAVIDSON, 2006). Em vista disso, um arsenal de proteínas está envolvido nesse processo e algumas destas proteínas foram identificadas no lavado foliar das folhas de cacau, desempenhando funções em diferentes etapas da transcrição, inclusive em processos pós-transcricionais como o processamento do mRNA. Pode-se citar a RNA polimerase III dependente de DNA que participa da síntese pequenos rRNAs e tRNA (JANNE; BARDIN; JACOB, 1975), o fator de transcrição da família REM16 contendo domínio B3, envolvidos na ativação e regulação da transcrição e são expressos em tecidos jovens, como folhas imaturas e meristemas (FRANCO-ZORRILLA et al., 2002), o fator de alongação da transcrição IIS, fator de transcrição contendo domínio NAC. As proteínas RNA metiltransferase, proteína p14, proteína da família CRM e a proteína contendo pentatricopeptídeo auxiliam nas etapas de splicing e processamento de mRNA (ASAKURA; BARKAN, 2007; GEDDY; BROWN, 2007). Dentre estas proteínas destacam-se os fatores de transcrição NAC que são específicos de plantas e desempenham papéis fundamentais em diversas etapas de desenvolvimento e na regulação de estresses abióticos e bióticos (OLIVEIRA et al., 2011).

Proteínas como RAD4 e Endo/exonuclease fosfatase, além de outras funções participam de processos de reparação de DNA nas plantas, uma vez que estes estão sujeitos a danos causados por diversos fatores como erros durante a replicação, mutagênicos químicos, toxinas bacterianas e fúngicas, entre outros fatores (BRAY; WEST, 2005).

No filoplano foi detectada também a presença de proteínas desempenhando diferentes papéis como: a proteína transcetolase que participa da produção de energia na fotossíntese de plantas, participando do ciclo de Calvin e na rota oxidativa das pentoses fosfato (FLECHNER; DRESSEN; WESTHOFF, 1996), a proteína laccase 11, entre outras funções, está envolvida na síntese de lignina da parede celular em plantas (KUNAMNENI et al., 2008), a proteína PTR3B transportadora de peptídeo. Esta proteína participa do transporte de di-/tripeptídeos através de membranas citoplasmáticas ou internas de uma variedade de organismos (HAUSER et al., 2001).

As proteínas com domínio  $\alpha - \beta$  - hidrolases e a proteína O-glicosilhidrolase identificadas na superfície foliar são enzimas que normalmente participam de funções catalíticas da célula como metabolismo de lipídeos e carboidratos, respectivamente (HOLMQUIST, 2000; TAYLOR et al., 2008). A proteína fosfatidilcolina-esterol O-acetiltransferase também está envolvida nas reações bioquímicas dos lipídios e esteróides, além de envolvimento na senescência das folhas, uma vez que a falta de esteróides leva a um envelhecimento precoce das folhas nas plantas (BOUVIER-NAVE et al., 2010). As Proteínas contendo domínio armadilo são encontradas em proteomas de todos os eucariotos e estão envolvidos em muitas funções biológicas, incluindo transdução de sinais em respostas hormonais, regulação na degradação da proteína-alvo, sendo importante em processos de desenvolvimento da planta (KIM et al., 2004).

Além dessas proteínas de plantas encontradas no lavado foliar de cacau, algumas proteínas de bactérias foram identificadas, uma vez que o filoplano fornece um nicho ecológico para diversas comunidades microbianas simbióticas, sendo que estes microrganismos e seus compostos podem contribuir com a proteção da planta auxiliando na tolerância a estresses

bióticos e abióticos, com uma maior eficiência fotossintética e nutrientes (INNEREBNER; KNIEF; VORHOLT, 2011).

Algumas dessas proteínas de bactérias foram identificadas envolvidas em processos da biossíntese de proteína. Destacamos os fatores de alongação G, Tu e Ts, com funções de catálise da etapa de translocação do ribossomo dependente de GTP durante o alongamento da tradução, ligação do RNA transportador aminoacil em sítios de ribossomo e ligação ao fator de alongação Tu para liberação do GTP, respectivamente (HELGSTRAND et al., 2007). Outras proteínas como L4 e L7 / L12 50 S ribossomal são encontradas na superfície da subunidade maior do ribossomo, a primeira auxiliando o dobramento e montagem do RNA ribossômico, e a segunda garantindo a integridade estrutural do ribossomo e participando da hidrólise de GTP durante o alongamento na tradução, respectivamente (ZENDEL et al., 2003; HELGSTRAND et al., 2007). Outra proteína identificada foi a Poli-ribonucleotídeo nucleotidiltransferase envolvida no processamento de transcritos primários em mRNA maduro (Uniprot – <http://www.uniprot.org/>).

A proteína chaperonina 60 foi também identificada e está envolvida no dobramento, montagem e desdobramento de outros polipeptídeos ou moléculas de RNA, incluindo processos de transporte, oligomerização que possam ser submetidos, bem como redobramento de proteínas e RNAs que foram desnaturadas, por exemplo, por algum tipo de estresse (HENDERSON; ALLAN; COATES, 2006). A proteína psTS ligante de fosfato está envolvida no transporte de fosfato ou metabólitos, podendo estar relacionada também com resposta ao estresse (AGUENA; FERREIRA; SPIRA, 2009). Podem-se citar também a subunidade  $\beta$ -ATP sintase que participa do transporte de prótons através da membrana gerando um gradiente eletroquímico e regulação da síntese de ATP, a proteína de membrana omp 38 com papel na difusão de íons e substâncias e, por fim, a subunidade proteolítica da protease Clp dependente de ATP, a qual cliva proteínas em um processo que requer a hidrólise de ATP (ANDERSSON et al., 2009).

### 5.3 Análise da densidade de tricomas e do efeito da irrigação nas folhas quanto à resistência do cacau

Na análise da quantificação dos tricomas nas variedades contrastantes de cacau foi possível notar uma diferença no número de tricomas glandulares por área de filoplano. Essa variação correspondeu ao dobro nas folhas jovens e quase o triplo nos meristemas em plantas de CCN51 em relação à Catongo.

Essa observação sugere que os tricomas representam uma defesa física, pois impedem que insetos circulem livremente, diminuindo assim a herbivoria e a aderência de microrganismos patogênicos na superfície foliar das plantas que muitas vezes são levados nas patas desses insetos. Além de representarem uma defesa química, já que produzem metabólitos secundários e proteínas envolvidas nos mecanismos de defesa na folha (HULME; BEKMAN, 2002).

No experimento em que plantas de Catongo e CCN51 foram inoculadas com o fungo *M. pernicioso* para analisar o efeito da lavagem das folhas por irrigação na suscetibilidade do cacau quanto à infecção por *M. pernicioso*, foi evidenciado que nas plantas que tiveram somente o solo molhado, sem lavagem das folhas a taxa de infecção pelo fungo foi menor do que nas plantas molhadas, bem como a severidade da doença, sustentando assim, a ideia de que as plantas devem acumular compostos e proteínas no filoplano que podem participar no combate inicial ao patógeno. Também foi verificada diferenças altamente significativas tanto na taxa de infecção quanto na severidade da doença entre genótipos, o que já era esperado, uma vez que a variedade CCN51 apresenta uma maior resistência à doença vassoura-de-bruxa.

Isso corrobora com os dados de identificação de proteínas no lavado foliar das plantas de cacau, nos quais demonstraram inúmeras proteínas envolvidas diretamente ou indiretamente nos mecanismos de defesa da superfície da folha, como a quinase com domínio leucina, sintase do  $\beta$ -cariofileno e ciclase do terpeno (Tabela 6). Algumas proteínas apresentaram peptídeo sinal, como por exemplo, a proteína quinase com domínio leucina e lacase, o que indica que a síntese é dirigida para a via secretora, podendo ser excretadas para o filoplano.

Várias proteínas que foram identificadas no filoplano são conhecidas por desempenhar função em processos metabólicos citoplasmáticos (exemplo: síntese proteica) ou nucleares, como aquelas envolvidas no metabolismo de ácidos nucleicos. Contudo, a presença dessas proteínas no filoplano, não deve ser considerada um extravasamento aleatório de proteínas do interior das células para o filoplano, pois neste caso, seriam identificadas as proteínas comumente mais abundantes no citosol, como aquelas envolvidas no metabolismo energético.

Algumas proteínas também podem apresentar-se em níveis basais de expressão em células epidérmicas ou periféricas, e sua secreção para o apoplasto poderia permitir a distribuição ou lixiviação do fluido apoplástico para o filoplano. Essa deposição de proteínas no filoplano poderia ser permitida também por estômatos, poros epidérmicos, como hidatódios, e pelos tricomas, seja por secreção ou ruptura de células (SHEPHERD; WAGNER, 2007).

Este trabalho é pioneiro na identificação massiva de proteínas do filoplano por meio de abordagem proteômica e é revelador, mostrando que a microbiota simbiote do filoplano pode ter grande importância na secreção de proteínas para a superfície foliar, podendo, com isso, afetar a primeira batalha molecular que se estabelece entre patógeno e hospedeiro nesse ambiente.



## 6. CONCLUSÕES

- O genoma do *T. cacao* possui o gene homólogo a filoplanina do tabaco que codifica uma proteína de 16 kDa.
- O cacau possui o gene da filoplanina, mas a proteína não acumula no filoplano em níveis elevados como no tabaco.
- O genótipo de cacau resistente CCN51 possui uma maior quantidade de tricomas glandulares curtos e por isso, possivelmente, possui maior abundância de metabólitos e proteínas de defesa no filoplano.
- Componentes hidrossolúveis no filoplano são importantes na defesa da planta, conforme mostrado pela maior incidência e severidade da doença vassoura-de-bruxa em plantas irrigadas por aspersão antes da inoculação com basidiósporo de *M. perniciosa*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIBUS. Anuário da agricultura brasileira. São Paulo. 2004 (Consultoria & Comércio)
- AGRIOS, G. N. Plant pathology. San Diego. 1997. 635 p.
- AGUENA, M.; FERREIRA, G. M.; SPIRA, B. Stability of the *pstS* transcript of *Escherichia coli*. Arch Microbiol, v.191, n.2, Feb, p.105-12. 2009.
- AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. Mycologia, v.97, n.5, September 1, 2005, p.1012-1022. 2005.
- ALMEIDA, O. C.; CHIACCHIO, F. P. B.; ROCHA, H. M. Sobrevivência de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer em vassouras secas de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) do estado da Bahia. Agrotrópica, v.9, p.23-28. 1997.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res, v.25, n.17, Sep 1, p.3389-402. 1997.
- ALVERSON, W. S.; WHITLOCK, B. A.; NYFFELER, R.; BAYER, C.; BAUM, A. 1999. Phylogeny of the core Malvales: evidence from *ndhF* sequence data. American Journal of Botany, v. 86, p. 1474 - 1486, 1999.
- ANDERSSON, F. I. et al. Structure and function of a novel type of ATP-dependent Clp protease. J Biol Chem, v.284, n.20, May 15, p.13519-32. 2009.
- ARGOUT, X. et al. Towards the understanding of the cocoa transcriptome: Production and analysis of an exhaustive dataset of ESTs of *Theobroma cacao* L. generated from various tissues and under various conditions. BMC Genomics, v.9, n.1, p.512. 2008.
- ARNOLD, A. E. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.100, n.26, p.15649-15654. 2003.
- ASAKURA, Y.; BARKAN, A. A CRM Domain Protein Functions Dually in Group I and Group II Intron Splicing in Land Plant Chloroplasts. The Plant Cell Online, v.19, n.12, December 1, 2007, p.3864-3875. 2007.
- BAKER, D.; SALI, A. Protein Structure Prediction and Structural Genomics. Science, v.294, n.5540, October 5, 2001, p.93-96. 2001.
- BASTOS, C. N. Epifitologia, hospedeiros e controle da vassoura-de-bruxa *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. Boletim técnico (CEPLAC/CEPEC), v.168, p.21. 1990.
- \_\_\_\_\_. Potential of *Trichoderma viride* for control of cocoa witches' broom (*Crinipellis pernicioso*). Fitopatologia Brasileira, v.21, p.509-512. 1996.

- BASTOS, E. Cacau, a riqueza agrícola da América. São Paulo. 1987. 103 p.
- BEATTIE, G. A. Leaf surface waxes and the process of leaf colonization by microorganisms. In: S. E. E. A. Lindow (Ed.). In Phyllosphere Microbiology: APS Press, 2002. Leaf surface waxes and the process of leaf colonization by microorganisms, p.3-26
- BOUVIER-NAVE, P. et al. Involvement of the phospholipid sterol acyltransferase1 in plant sterol homeostasis and leaf senescence. Plant Physiol, v.152, n.1, Jan, p.107-19. 2010.
- BOUVIER, F.; RAHIER, A.; CAMARA, B. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. Prog Lipid Res, v.44, n.6, Nov, p.357-429. 2005.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v.72, n.1-2, p.248-254. 1976.
- BRAY, C. M.; WEST, C. E. DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. New Phytologist, v.168, n.3, p.511-528. 2005.
- BRENCIC, A.; WINANS, S. C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev, v.69, p.155-194. 2005.
- CEITA 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.12. 2007.
- CEPLAC. 2011a.
- \_\_\_\_\_. Cacau: informações de mercado. Brasília. Informe técnico, v.12, p.1-12. 2011b.
- CHAPPELL, J. Biochemistry and Molecular Biology of the Isoprenoid Biosynthetic Pathway in Plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v.46, n.1, p.521-547. 1995.
- CHISHOLM, S. T. et al. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. Cell, v.124, n.4, p.803-814. 2006.
- CHRISTIANE, N. Unraveling the complex network of cuticular structure and function. Current Opinion in Plant Biology, v.9, n.3, p.281-287. 2006.
- COUTO, V. D. A. O território do cacau no contexto da mundialização. Bahia Análises & Dados, v.9, p.38-52. 2000.
- CUENCA, M. A. G.; NAZÁRIO, C. C. Importância Econômica e Evolução da Cultura do Cacau no Brasil e na Região dos Tabuleiros Costeiros da Bahia entre 1990 e 2002. Embrapa Tabuleiros Costeiros, v.72, p.25. 2004.
- DAUB; HAGEDORN. Resistance of Phaseolus line WBR133 to Pseudomonas syringae. Phytopathology, v.69, p.946-951. 1979.

DAVIDSON, E. H. The Regulatory Genome: Gene Regulatory Networks in Development and Evolution. Nova Iorque, NY: Academic Press. 2006. 304 p.

DE ARRUDA, M. C. C. et al. Comparison of *Crinipellis pernicios*a isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. Plant Pathology, v.52, n.2, p.236-244. 2003.

DE LUCCA, A. J.; CLEVELAND, T. E.; WEDGE, D. E. Plant-derived antifungal proteins and peptides. Canadian Journal of Microbiology, v.51, n.12, 2005/12/01, p.1001-1014. 2005.

DE WIT, P. J. How plants recognize pathogens and defend themselves. Cell Mol Life Sci, v.64, n.21, Nov, p.2726-32. 2007.

DELMOTTE, N. et al. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A, v.106, n.38, Sep 22, p.16428-33. 2009.

EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicios*a, causal agent of witches' broom disease of cocoa. Transactions of the British Mycological Society, v.74, n.3, p.515-523. 1980.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations FAOSTAT 2011.

FLECHNER, A.; DRESSEN, U.; WESTHOFF, P. Molecular characterization of transketolase (EC 2.2.1.1) active in the Calvin cycle of spinach chloroplasts. Plant Mol Biol v. Nov; 32(3), p.475-84. 1996.

FRANCO-ZORRILLA, J. M. et al. AtREM1, a Member of a New Family of B3 Domain-Containing Genes, Is Preferentially Expressed in Reproductive Meristems. Plant Physiology, v.128, n.2, February 1, 2002, p.418-427. 2002.

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

GARCIA, O. et al. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora pernicios*a, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. Mycol Res, v.111, n.Pt 4, Apr, p.443-55. 2007.

GEDDY, R.; BROWN, G. Genes encoding pentatricopeptide repeat (PPR) proteins are not conserved in location in plant genomes and may be subject to diversifying selection. BMC Genomics, v.8, n.1, p.130. 2007.

GESTEIRA, A. S. et al. Comparative Analysis of Expressed Genes from Cacao Meristems Infected by *Moniliophthora pernicios*a. Annals of Botany, v.100, n.1, p.129-140. 2007.

GRIFFITH et al. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. Wellington, NOUVELLE-ZELANDE: Scientific and Industrial Research Publishing, v.41. 2003. 13 p.

GRUNWALD, I. et al. Identification of guttation fluid proteins: the presence of pathogenesis-related proteins in non-infected barley plants. Physiologia Plantarum, v.119, n.2, p.192-202. 2003.

- GUNATILAKA, A. A. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. J Nat Prod, v.69, n.3, Mar, p.509-26. 2006.
- H.C, E. Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. Transactions of the British Mycological Society, v.74, n.3, p.515-523. 1980.
- HARADA, E. et al. Expression Profiling of Tobacco Leaf Trichomes Identifies Genes for Biotic and Abiotic Stresses. Plant and Cell Physiology, v.51, n.10, October 1, 2010, p.1627-1637. 2010.
- HARRISON, N. A.; DAVIS, M. J. Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subs *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon-stuning disease. Phytopathology, p.722-727. 1988.
- HAUSER, M. et al. Multiplicity and regulation of genes encoding peptide transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Membrane Biology, v.18, n.1, p.105-112. 2001.
- HELGSTRAND, M. et al. The Ribosomal Stalk Binds to Translation Factors IF2, EF-Tu, EF-G and RF3 via a Conserved Region of the L12 C-terminal Domain. Journal of Molecular Biology, v.365, n.2, p.468-479. 2007.
- HENDERSON, B.; ALLAN, E.; COATES, A. R. M. Stress Wars: the Direct Role of Host and Bacterial Molecular Chaperones in Bacterial Infection. Infection and Immunity, v.74, n.7, July 2006, p.3693-3706. 2006.
- HOLMQUIST, M. Alpha Beta-Hydrolase Fold Enzymes Structures, Functions and Mechanisms Curr Protein Pept Sci, v. Sep;1(2), p. 209-35. 2000.
- HOLLIDAY, P. Fungus Diseases of Tropical Crops. New York: Dover Pub. Inc. 1980
- HULME, P. E.; BEKMAN, C. W. Granivory. In: C. M. P. Herrera, O. (Ed.). Plant-animal interactions: an evolutionary approach: Blackwell Science, Cornwall, 2002. Granivory, p.132-156
- INÁCIO, J. et al. Estimation and Diversity of Phylloplane Mycobiota on Selected Plants in a Mediterranean-Type Ecosystem in Portugal. Microbial Ecology, v.44, n.4, p.344-353. 2002.
- INNEREBNER, G.; KNIEF, C.; VORHOLT, J. A. Protection of *Arabidopsis thaliana* against Leaf-Pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* Strains in a Controlled Model System. Applied and Environmental Microbiology, v.77, n.10, May 15, 2011, p.3202-3210. 2011.
- JANNE, O.; BARDIN, C. W.; JACOB, S. T. DNA-dependent RNA polymerases I and II from kidney. Effect of polyamines on the in vitro transcription of DNA and chromatin. Biochemistry, v.14, n.16, Aug 12, p.3589-97. 1975.
- JOHAL, G. S. et al. Convergent insights into mechanisms determining disease and resistance response in plant–fungal interactions. Canadian Journal of Botany, v.73, n.S1, 1995/12/31, p.468-474. 1995.

- KARAMANOLI, K. et al. Bacterial colonization of the phyllosphere of nineteen plant species and antimicrobial activity of their leaf secondary metabolites against leaf associated bacteria. Chemoecology, v.15, n.2, p.59-67. 2005.
- KARIOTI, A. et al. Erinea formation on Quercus ilex leaves: anatomical, physiological and chemical responses of leaf trichomes against mite attack. Phytochemistry, v.72, n.2-3, Feb, p.230-7. 2011.
- KILARU, A.; HASENSTEIN, K. H. Development and Pathogenicity of the Fungus Crinipellis pernicioso on Interaction with Cacao Leaves. Phytopathology, v.95, n.1, Jan, p.101-7. 2005.
- KIM, S. et al. ARIA, an Arabidopsis Arm Repeat Protein Interacting with a Transcriptional Regulator of Abscisic Acid-Responsive Gene Expression, Is a Novel Abscisic Acid Signaling Component. Plant Physiology, v.136, n.3, November 1, 2004, p.3639-3648. 2004.
- KLIEBENSTEIN, D. J.; ROWE, H. C.; DENBY, K. J. Secondary metabolites influence Arabidopsis/Botrytis interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. The Plant Journal, v.44, n.1, p.25-36. 2005.
- KÖLLNER, T. G. et al. A Maize (E)- $\beta$ -Caryophyllene Synthase Implicated in Indirect Defense Responses against Herbivores Is Not Expressed in Most American Maize Varieties. The Plant Cell Online, v.20, n.2, February 1, 2008, p.482-494. 2008.
- KRIS-ETHERTON, P. M.; KEEN, C. L. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. Curr Opin Lipidol, v.13, n.1, Feb, p.41-9. 2002.
- KROUMOVA, A. B.; SHEPHERD, R. W.; WAGNER, G. J. Impacts of T-Phylloplanin Gene Knockdown and of Helianthus and Datura Phylloplanins on Peronospora tabacina Spore Germination and Disease Potential. Plant Physiology, v.144, n.4, August 1, 2007, p.1843-1851. 2007.
- KUMAR, A.; BENNETZEN, J. L. Plant retrotransposons. Annu Rev Genet, v.33, p.479-532. 1999.
- KUNAMNENI, A. et al. Laccases and Their Applications: A Patent Review. Recent Patents on Biotechnology, v.2, n.1, p.10-24. 2008.
- LABANCA, E. R. G. Purificação parcial de elicitores presentes em Saccharomyces cerevisiae: atividade como indutores de resistência em pepino (Cucumis sativus) contra Colletotrichum lagenarium e da síntese de gliceolinas em soja (Glycine max). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2002. 118 p.
- LAI, Y.; GALLO, R. AMPed Up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. Trends Immunol, p.131-141. 2008.
- LAWRENCE, J. S.; CAMPÊLO, A. M. F. L.; FIGUEIREDO, J. M. Enfermidades do cacauzeiro. II-Doenças fúngicas que ocorrem nas folhas, ramos e tronco. Agrotrópica, v.3, p. 1-14. 1991.
- LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the Phyllosphere. Applied and Environmental Microbiology, v.69, n.4, April 1, 2003, p.1875-1883. 2003.

- LOOMAN, A. C. et al. Nucl. Acids Res., v.14, p.5481-5497. 1986.
- LUCAS, J. A. Plant Pathogens and Plant Diseases. Plant Pathology, v.47, n.4, p.542-542. 1998.
- MENEZES, J. A. D. S.; CARMO-NETO, D. A modernização do Agribusiness Cacau. 1993. 223 p.
- MORRIS, C. E.; KINKEL, L. L. Fifty years of phyllosphere microbiology: significant contribution to research in related fields. In: E. I. H.-P. S. E. Lindow, and V. Elliott (Ed.). Phyllosphere microbiology. St. Paul: APS Press, 2002. Fifty years of phyllosphere microbiology: significant contribution to research in related fields, p.365-375
- MUSE, R. B. 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.
- NEUHOFF, V. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis, v.9, p.255-262. 1988.
- OLIVEIRA, T. M. D. et al. Analysis of the transcription factor gene family in citrus reveals a novel member involved in multiple abiotic stress responses Tree Genetics & Genomes, v. 7, p.1123-1134. 2011.
- ORCHARD, J. et al. Changes in morphology and measurement of cytokinin levels during the development of witches' brooms on cocoa. Plant Pathology, v.43, n.1, p.65-72. 1994.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: A. K. Bergamin Filho, H.; Amorim, L. (Ed.). Manual de fitopatologia. Princípios e conceitos. São Paulo: Ceres, v.1, 1995. Hospedeiro: mecanismos de resistência, p.417-453
- PEREIRA, J. L. M.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. M.; ALMEIDA, L. C. C. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. Agrotropica, v.1, p. 79-81. 1989.
- PEREIRA, JL. 1999. Renewed advance of witches' broom disease of cocoa: 100 years later. In: International Cocoa Research Conference, 12th, Salvador, Bahia, Brasil, 1996. Proceedings. Lagos, Nigeria: Cocoa Producers' Alliance: 87-91.
- PILEUR, F.; TOULME, J.-J.; CAZENAVE, C. Eukaryotic ribonucleases HI and HII generate characteristic hydrolytic patterns on DNA-RNA hybrids: further evidence that mitochondrial RNase H is an RNase HII. Nucleic Acids Research, v.28, n.18, September 15, 2000, p.3674-3683. 2000.
- PIRES, A. B. L. et al. Early development of *Moniliophthora perniciosas* basidiomata and developmentally regulated genes. BMC Microbiology, v.9, n.1, p.158. 2009.
- PURDY, L.; SCHMIDT, R. STATUS OF CACAO WITCHES' BROOM: Biology, Epidemiology, and Management. Annual Review of Phytopathology, v.34, n.1, p.573-594. 1996.

- RODRIGUES, M. A.; KERBAUY, G. B. Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. Hoehnea, p.525- 549. 2009
- SAHDEV, S.; KHATTAR, S.; SAINI, K. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. Molecular and Cellular Biochemistry, v.307, n.1, p.249-264. 2008.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, E. F. T. Molecular cloning - a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor, v.3. 1989
- SANTOS FILHO, L. P. et al. Produção de cacau e a vassoura-de-bruxa na Bahia. Agrotópica, v.20, p.73-82. 2008.
- SANTOS FILHO, L. P. E. A. Produção de cacau e a vassoura-de-bruxa na Bahia. Agrotópica, v.20, p. 73-82. 2008.
- SCHALLER, A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases Planta, v.220, p.183-197. 2004.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: S. F. L. Pascholati, B.; Stangarlin, J.R.; Cia, P. (Ed.). Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ, 2008. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal, p.227-248
- SCHWEITZER, J. A. et al. The role of plant genetics in determining above- and below-ground microbial communities. In: M. J. Bailey, Lilley, A.K., Timms-Wilson, P.T.N. And Spencer-Phillips, e P.T.N. (Ed.). Microbial Ecology of the Aerial Plant Surface. Wallingford, UK: CABI International, 2006. The role of plant genetics in determining above- and below-ground microbial communities, p.107-119
- SHEPHERD, R. W. et al. Phylloplanins of Tobacco Are Defensive Proteins Deployed on Aerial Surfaces by Short Glandular Trichomes. The Plant Cell Online, v.17, n.6, June 1, 2005, p.1851-1861. 2005.
- SHEPHERD, R. W.; WAGNER, J. G. Phylloplane proteins: emerging defenses at the aerial frontline? TRENDS in Plant Science, v. Vol.12, n.2, p.51-56. 2007.
- SHEWRY, P. Plant Proteins that Confer Resistance to Pests and Pathogens. Journal of Experimental Botany, v.42, n.supp1, May 1, 1991, p.3-7. 1991.
- SILVA, F. S. Variabilidade patogênica de *Moniliophthora perniciosa* em três agrossistemas da região cacaueira baiana. Produção Vegetal, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - BA, 2009. 53 p.
- SILVA, R. A. et al. Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos: Embrapa Agrobiologia, v.ISSN 1517-8498; 250. 2008. 49 p.
- SILVA, S. D. V. M. et al. Resistencia do cacauero a *Crinipellis perniciosa*: produção de basidiomas outra variavel para avaliacao. Fitopatologia Brasileira, v.27, p.167. 2002.



- SOUZA, C. A. S.; DIAS, L. A. S. Melhoria ambiental e sócio-economia. In: L. A. S. Dias (Ed.). Melhoria genética do cacaueteiro. Viçosa: FUNAPE - UFG, 2001. Melhoria ambiental e sócio-economia, p.1-47
- SREENIVASAN, T. N.; SARYDEEN, S. Modes of penetration of young cocoa leaves by Crinipellis pernicioso. St. Paul, MN, ETATS-UNIS: American Phytopathological Society, v.73. 1989
- STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. Scientia Agraria Paranaensis, v.10, n.1, p.18-46. 2011.
- SURMACZ, L.; SWIEZEWSKA, E. Polyisoprenoids – Secondary metabolites or physiologically important superlipids? Biochemical and Biophysical Research Communications, v.407, n.4, p.627-632. 2011.
- TAYLOR, L. E. et al. Heterologous expression of glycosyl hydrolases in planta: a new departure for biofuels. Trends in biotechnology, v.26, n.8, p.413-424. 2008.
- TESSIER, L. H. et al. Nucleic Acids Res., v.12, p.7663-7675. 1984.
- VALENZUELA B, A. EL CHOCOLATE, UN PLACER SALUDABLE. Revista chilena de nutrición, v.34, p.180-190. 2007.
- VIRGENS FILHO, A. C. et al. A CEPLAC e a crise da lavoura cacaueteira. Ilhéus. 1993. 30p p.
- VON BORCKE, L. Microbial proteins for broad spectrum pathogen resistance. PBL Technology. 2010.
- WAGNER, G. J.; WANG, E.; SHEPHERD, R. W. New Approaches for Studying and Exploiting an Old Protuberance, the Plant Trichome. Annals of Botany, v. 93, p.3-11. 2004.
- WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. AmiGO browser Induced resistance for plant defence. 2007.
- WANG, C.-S. et al. Characterization of a Desiccation-Related Protein in Lily Pollen during Development and Stress. Plant and Cell Physiology, v.39, n.12, December 1, 1998, p.1307-1314. 1998.
- WHIPPS, J. M. et al. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. J Appl Microbiol, v.105, n.6, Dec, p.1744-55. 2008.
- ZENGEL, J. M. et al. The extended loops of ribosomal proteins L4 and L22 are not required for ribosome assembly or L4-mediated autogenous control RNA Society, v.9, p.1188-1197. 2003.
- ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. FEMS Microbiol Rev, v.32, n.5, Aug, p.723-35. 2008.