

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



**ANÁLISE DE MECANISMOS BIOQUÍMICOS PRÉ-
INFECCIONAIS NO FILOPLANO DE *Theobroma cacao***

MARIA ZUGAIB CAVALCANTI MELO

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Dezembro de 2020

MARIA ZUGAIB CAVALCANTI MELO

**ANÁLISE DE MECANISMOS BIOQUÍMICOS PRÉ-
INFECCIONAIS NO FILOPLANO DE *Theobroma cacao***

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

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Dezembro de 2020

MARIA ZUGAIB CAVALCANTI MELO

**ANÁLISE DE MECANISMOS BIOQUÍMICOS PRÉ-
INFECCIONAIS NO FILOPLANO DE *Theobroma cacao***

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

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 18 de dezembro de 2020

Prof^a. Dra. Joise Hander Mares
(IFBA)

Prof^a. Dra. Dayanne S. M. de Almeida
(UESC)

Prof.^a Dra. Laís Freire Santos
(EAI)

Prof^a. Dra. Milena do Amaral Santos
(UESC)

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

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família, que se faz presente em todos os momentos da minha vida.

EPÍGRAFE

*“Tudo o homem pode, só depende é do
querer”*

Mestre Gabriel

ÍNDICE

EXTRATO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	14
3. HIPÓTESE	16
4. OBJETIVOS	16
CAPÍTULO 1:	17
Preinfection Mechanisms Of The Phylloplane: The First Battle Between The Cocoa Tree And Their Pathogen	17
Abstract	17
Introduction	18
The cocoa phylloplane, the first battlefield	19
Germination of fungal spores: initial stage of disease establishment	23
Acknowledgements	25
Formatting of funding sources	25
Competing financial interests	25
References	25
CAPÍTULO 2	31
Caracterização da filoplanina de <i>Theobroma cacao</i> por expressão em sistema heterólogo	31
Resumo	31
1. Introdução	32
2. Material e métodos	34
2.1 Análises <i>in vitro</i>	34
2.1.1 Transformação bacteriana para a obtenção do TcPHYLL	34
2.1.2 Teste de Expressão	36

2.1.3. Indução e purificação da TcPHYLL ^{Q84-T158} e inserida no pMAL-c5x	38
2.2 Produção de anticorpos	38
2.2.1 Imunização dos animais	38
2.2.2 Obtenção do soro imune à proteína TcPHYLL ^{Q84-T158}	39
2.2.3 Titulação do anticorpo (Dot-blot)	40
2.3 Análise de Bioinformática	41
2.3.1 Análise de alinhamento da filoplanina de cacau com a sequência de proteína alergênica de pólen Ole e 1 e filoplanina de <i>Arabidopsis</i>	41
2.3.2 Construção do modelo tridimensional de TcPHYLL	42
3. Resultados	43
3.1 Expressão da filoplanina recombinante em sistema heterólogo	43
3.2 Ensaio de titulação do anticorpo (Dot-Blot)	47
3.3 Análise de bioinformática da sequência da filoplanina de cacau e modelo tridimensional de TcPHYLL	47
4. Discussão	50
5. Referência Bibliográfica	55
6. CONCLUSÃO GERAL	61

EXTRATO

ZUGAIB, Maria Cavalcanti Melo. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 18 de dezembro de 2020. **Análise de mecanismos bioquímicos pré-infeccionais na interação de *Moniliophthora perniciosa* e *Theobroma cacao***. Orientador: Carlos Priminho Pirovani. Coorientador: Dr^a. Karina Peres Gramacho.

A maioria dos fungos fitopatogênicos inicia seu ciclo de vida com a germinação dos basidiósporos na superfície de órgãos jovens da planta hospedeira. O filoplano é a primeira linha de defesa da planta e apresenta uma barreira física constituída por cutícula, cera e tricomas simples e glandulares. Os tricomas glandulares são estruturas secretoras de metabólitos secundários e proteínas. A filoplanina é uma glicoproteína secretada que foi detectada pela primeira vez em lavado foliar de *Nicotina tabacum* e possui capacidade inibitória do fungo *Peronospora tabacina*. No filoplano de genótipo de cacau resistente à *Moniliophthora perniciosa* ocorre maior quantidade de tricomas do que o genótipo suscetível, sugerindo maior abundância de compostos bioquímicos que participam da defesa inicial. A filoplanina do cacau ainda não foi detectada em lavado foliar, mas estudos realizados com o seu transcrito (*TcphylI*) revelam propriedades importantes da proteína. O objetivo deste trabalho é conhecer os mecanismos bioquímicos pré-infeccionais do filoplano do cacau e identificar qual a região funcional da filoplanina do cacau. No capítulo 1, uma revisão literária abordando os principais estudos sobre o filoplano do cacau e o mecanismo de germinação de *M. perniciosa* foi realizada. O capítulo 2 contempla esforços visando a caracterização funcional da filoplanina. O primeiro capítulo apresenta estudos moleculares que contribuiram para ampliar o entendimento sobre os mecanismos iniciais na interação de *Theobroma cacao* e *M. perniciosa*. O segundo apresenta diferentes testes de expressão em sistema heterólogo em *Escherichia coli*, seguido de análises de bioinformática. Os resultados mostram que a expressão heteróloga em *E. coli* não é eficiente para a produção da filoplanina recombinante de cacau inteira. A expressão do segmento aminoterminal da proteína, contendo 60 aminoácidos do domínio Ole e1, também não é eficiente em *E. coli*, mesmo em estirpes especializadas para expressão de proteínas tóxicas como a C41(DE3) e a C43(DE3). Por outro lado, uma versão truncada com a eliminação da maior parte do domínio Ole e1 é expressa eficientemente na fração solúvel do extrato de *E. coli*. A versão truncada da filoplanina produzida nesse trabalho foi utilizada como imunógeno

para a produção de anticorpos a ser empregados em estudos funcionais da proteína no patossistema. Assim, podemos propor a região funcional da proteína e abrimos possibilidades para a produção de peptídeos funcionais de tamanho reduzido a partir de versões truncadas da filoplanina, para fins biotecnológicos. O presente trabalho contribui para compreender melhor o funcionamento da batalha molecular no estágio inicial desse patossistema. No entanto, ainda são necessários mais estudos moleculares com a filoplanina do cacau.

Palavras-chave: defesa inata, mecanismo de germinação, interação planta-patógeno, filoplanina, sistema heterólogo.

ABSTRACT

ZUGAIB, Maria Cavalcanti Melo. State University of Santa Cruz, Ilhéus, 18 de dezembro de 2020. **Analysis of preinfection biochemical mechanisms in the interaction of *Moniliophthora perniciosa* and *Theobroma cacao***. Advisor: Carlos Priminho Pirovani. Co-advisors: Dr^a. Karina Peres Gramacho.

Most phytopathogenic fungi start their life cycle with the germination of basidiospores on the surface of young organs of the host plant. The phylloplane is the first line of defense of the plant and presents a physical barrier consisting of cuticle, wax and simple and glandular trichomes. The glandular trichomes are secretory structures of secondary metabolites and proteins. Phylloplanin is a secreted glycoprotein that was first detected in leaf wash of *Nicotina tabacum* and has the inhibitory capacity of the fungus *Peronospora tabacina*. In phylloplane cocoa genotype resistant *Moniliophthora perniciosa* is larger amount of trichomes of the susceptible genotype, suggesting a greater abundance of biochemical compounds involved the initial defense. The phylloplanin of cocoa has not yet been detected in leaf wash, but studies carried out with its transcript (*Tcphyll*) reveal important properties of the protein. The objective of this work is to understand the biochemical mechanisms of the preinfection of the cocoa phylloplane and to analyze the function of the cocoa phylloplanin. In chapter 1, a literary review addressing the main studies on the cocoa phylloplane and the germination mechanism of *M. perniciosa*. Chapter 2 contemplates efforts aimed at the functional characterization of phylloplanin. The first chapter presents molecular studies that contribute to broaden the understanding of the initial mechanisms in the interaction of *Theobroma cacao* and *M. perniciosa*. The second presents different expression tests in a heterologous system in *Escherichia coli*, followed by bioinformatics analyzes. The results show that heterologous expression in *E. coli* is not efficient for the production of completely cocoa recombinant phylloplanin. The expression of the amino-terminal segment of the protein, containing 60 amino acids from the Ole e1 domain, is also not efficient in *E. coli*, even in specialized strains for the expression of toxic proteins such as *C41 (DE3)* and *C43 (DE3)*. On the other hand, a truncated version with the elimination of most of the Ole e1 domain is expressed efficiently in the soluble fraction of the *E. coli* extract. The truncated version of the phylloplanin produced in this work was used as an immunogen for the production of antibodies to be

used in functional studies of the protein in the pathosystem. Thus, we can propose the functional protein region and open possibilities for the production of reduced functional peptides from truncated versions of phylloplanin, for biotechnological purposes. The present work contributes to a better understanding of the molecular battle functioning in the early stage of this pathosystem. However, further molecular studies with cocoa phylloplanin are still needed.

Key words: innate defense, germination mechanism, plant-pathogen, phylloplanin, heterologous system.

1. INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) tem seu centro de origem na floresta tropical úmida das regiões amazônicas (FULTON, 1989; MOTAMAYOR et al., 2008). Esta planta possui importância econômica, pois suas amêndoas é matéria-prima para produção do chocolate (JUDD et al., 2009) e também importância ambiental por ser cultivado em um sistema de cultivo agroflorestal sustentável (EVANS, 2007), nomeado cabruca. Atualmente, as doenças fúngicas presentes nas plantações de cacau têm causado perdas de 40% (World Cocoa Foundation, <http://www.worldcocoafoundation.org>), provocando grande impacto econômico nos países produtores.

Dentre as doenças fúngicas do cacauieiro, encontra-se a vassoura-de-bruxa, causada por *Moniliophthora perniciosa* (FULTON, 1989; AIME E PHILLIPS-MORA, 2005). Este fungo é hemibiotrófico, apresentando duas fases em seu ciclo, a fase biotrófica (parasítica) e a fase necrotrófica (saprofítica) (EVANS, 1981; revisado por PURDY E SCHMIDT, 1996; BAILEY et al., 2013). A infecção destes patógenos inicia com a germinação dos basidiósporos na superfície de órgãos jovens (filoplano) do cacau.

O filoplano constitui o primeiro contato do patógeno durante a invasão e também a primeira linha de defesa da planta (AGRIOS, 2005; SHEPHERD et al., 2005; SHEPHERD & WAGNER, 2007). Diante disso, é necessário compreender os primeiros mecanismos de defesa da superfície foliar do cacau, bem como as etapas moleculares que ocorrem durante a fase inicial do metabolismo de *M. perniciosa*. Esse conhecimento contribui para entender melhor como funcionam os processos bioquímicos pré-infeccionais da interação de *T. cacao* e *M. perniciosa*.

Em *T. cacao*, a proteção superficial é constituída por estruturas morfológicas pré-existentes – tricomas, ceras (NYADANU et al., 2012; ALMEIDA et al., 2017), compostos tóxicos secretados – metabólitos e proteínas (ALMEIDA et al., 2017); e a presença de microrganismos (SANTANA et al., 2018), os quais participam do controle dos fitopatógenos. Embora já se tenha conhecimento sobre algumas estratégias de defesa inicial do filoplano do cacau, ainda há poucos estudos abordando as proteínas secretadas pelos tricomas glandulares curtos que atuam na proteção contra o patógeno (FREIRE et al., 2017; ALMEIDA et al., 2017).

A primeira proteína secretada na superfície foliar identificada até o momento é a filoplanina. Esta foi detectada em lavado foliar de *Nicotiana tabacum*, *Datura metel* e *Helianthus annuus*, apresentando atividade antifúngica contra o fitopatógeno *Peronospora tabacina* (SHEPHERD et al., 2005; KROUMOVA et al., 2007). Além disso, já é sabido que esta proteína apresenta potencial biotecnológico, podendo vir a ser utilizada como componente de fungicidas e pomadas contra micoses humanas (KING et al., 2011; MATTUPALLI et al., 2014). A filoplanina ainda não foi detectada no lavado foliar de cacau (ALMEIDA et al., 2017). A caracterização do seu gene (*Tcphyll*), a análise da expressão do seu transcrito em diferentes tecidos e a atividade do seu promotor em plantas transgênicas de tabaco foram realizadas (FREIRE et al., 2017). Entretanto, ainda não está claro qual é a região funcional da filoplanina do cacau.

Diante destas pesquisas, o objetivo deste trabalho é apresentar estudos moleculares que contribuem para o entendimento sobre as estratégias de defesa inata do filoplano de *T. cacao* e os mecanismos iniciais da germinação dos esporos de *M. perniciosa*. Ainda, identificar qual é a região funcional da filoplanina do cacau e, com isso, caracterizar funcionalmente a proteína, por meio de expressão heteróloga em *E. coli*.

2. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5. ed. Elsevier Academic Press: San Diego, 2005. p.948.

ALMEIDA, D.S.M.; GRAMACHO, K.P.; CARDOSO, T.H.S.; MICHELI, F.; ALVIM, F.C.; PIROVANI, C.P. Cacao phylloplane: the first battlefield against *Moniliophthora perniciosa*, which causes witches' broom disease. **Phytopathology**, v. 102: 864-871. 2017.

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: 1012-1022. 2005.

BAILEY, B.A.; CROZIER, J.; SICHER, R.C.; STREM, M.D.; MELNICK, R. CARAZZOLLE, M.F. et al. Dynamic changes in pod and fungal physiology associated with the shift from biotrophy to necrotrophy during the infection of *Theobroma cacao* by *Moniliophthora roreri*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 81: 84-96. 2013.

EVANS, H.C. Cacao diseases – The trilogy revisited. **Phytopathology**, v. 97: 1640-1643. 2007.

FREIRE, L.S. SANTANA, J.O.; DE SOUSA A.O.; DOS SANTOS, J.B.; DE OLIVEIRA, I.B.; ALVIM, F.A. et al. TcPHYLL, a cacao phylloplanin expressed in young tissues and glandular trichomes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 100: 126-135. 2017.

FULTON, R.H. The cacao disease trilogy: Black pod, monilia pod rot and witches' broom. **Plant Disease**, v. 73: 601-603. 1989.

JUDD, W.S. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. Tradução André Olmos Simões et al. 3. ed. Artmed: Porto Alegre, 2009. p. 632.

KING, B.; WILLIAMS, D.W.; WAGNER, G.J. Phylloplanins Reduce the Severity of Gray Leaf Spot and Brown Patch Diseases on Turfgrasses. **Crop Science**, v. 51: 2829-2839. 2011.

MATTUPALLI C.; SPRAKER J.E.; BERTHIER E.; CHARKOWSKI A.O.; KELLER N.P.; SHEPHERD R.W. A microfluidic assay for identifying differential responses of plant and human fungal pathogens to tobacco phylloplanins. **Plant Health Progress**, v.15(3): 130-134. 2014.

MOTAMAYOR J.C. et al. Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L). PLoS ONE, v.3(10): e3311. 2008.

NYADANU et al. Host plant resistance to *Phytophthora* pod rot in cacao (*Theobroma cacao* L.): The role of epicuticular wax on pod leaf surfaces. **International Journal of Botany**, v. 8(1):13-21. 2012

PURDY, L.H.; SCHMIDT, R. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34: 573–94. 1996.

SANTANA, J.O.; GRAMACHO, K.P.; FERREIRA, K.S.E.; REZENDE, R.P.; MANGABEIRA, P.A.O.; DIAS, R.P.M. et al. Witches' broom resistant genotype CCN51 shows greater diversity of symbiont bacteria in its phylloplane than susceptible genotype catongo. BMC Microbiology, v. 18: 194. 2018.

SHEPHERD, R.W. et al Phylloplanins of tobacco are defensive proteins deployed on serial surfaces by short glandular trichomes. **Plant Cell**, v.17: 1851-1861. 2005.

SHEPHERD, R.W; WAGNER, G.J. Phylloplane proteins: emerging defenses at the aerial frontline? **Trends in Plant Science**, v.12 (2): 1360-1385. 2007.

3. HIPÓTESE:

- A proteína filoplanina de *Theobroma cacao* apresenta um domínio funcional tóxico a *E. coli*.

4. OBJETIVOS:

4.1 Geral

- Identificar a região funcional da proteína filoplanina de *Theobroma cacao*

4.2 Específicos

- Apresentar uma revisão literária abordando estudos bioquímicos sobre a defesa do filoplano e o mecanismo de germinação de esporos, com ênfase no patossistema *Theobroma cacao* - *Moniliophthora* sp;
- Caracterizar o domínio tipo Ole e 1 da filoplanina de *T. cacao* por expressão em sistemas heterólogos;
- Identificar a região da proteína essencial para sua atividade.

CAPÍTULO 1

(Manuscript submitted to *Scientia Horticulturae*)

Title:

Preinfection Mechanisms Of The Phylloplane: The First Battle Between The Cocoa Tree And Their Pathogens

Authors and Affiliations

Maria Zugaib^a, Monique R. Santana^a, Monaliza Macedo^a, and Carlos P. Pirovani^{a*}

^a Department of Biological Sciences, State University of Santa Cruz (UESC), Ilhéus – Bahia.

* CORRESPONDENCE:

Dr. Carlos Priminho Pirovani
pirovani@uesc.br

Abstract: The leaf surface has pre-existing morphological structures, secreted biochemical substances and microorganisms. This dynamic environment constitutes a plant's first line of defense, as well as the first contact of phytopathogens during an invasion. Spore germination starts in the phylloplane and is a fundamental phenomenon for the fungus cycle development and, consequently, the establishment of the disease. In this review, we address the phylloplane's innate defense mechanisms and biochemical reactions involved in the early stage of phytopathogenic fungi metabolism. The focus is to broaden the understanding of the preinfected molecular and biochemical processes of the interaction between *Theobroma cacao* and *Moniliophthora perniciosa* to establish how the defense mechanisms of the phylloplane act to inhibit the pathways involved at the beginning of germination. We conclude that the cocoa phylloplane is the first battleground, where the plant's innate defense acts to prevent the infection. Also, the germination mechanism of *M. perniciosa* presents specific proteins that contributes for the onset of infection and the development of the disease. Therefore, expanding the understanding of the way in which chemical mediators participate in the phylloplane defense under the specific proteins of the germination process and its signaling pathways is essential to develop technological strategies that can prevent diseases in cocoa crops.

Keywords: Phylloplane, *Theobroma cacao*, *Moniliophthora perniciosa*, preinfection mechanisms, innate defense, spore germination.

1. Introduction

The phylloplane represents a plant's first line of defense against pathogens due to its structural characteristics and functional aspects (Figure 1A). Structurally, it has a hydrophobic layer of wax and cuticle, as well as simple and glandular trichomes, which make it difficult for pathogen invasion. In addition, glandular trichomes constitutively secrete substances that act as a functional factor in the plant's innate defense (Agrios 2005; Shepherd et al. 2005; Shepherd and Wagner 2007; Glas et al., 2012; Almeida et al. 2017). Biochemical events in defense of the aerial surface of tissues are also influenced by microorganisms residing in the phylloplane (Lindow and Leveau 2003; Remus-Emsermann et al. 2014; Bringel and Couée 2015; Santana et al. 2018). These constitutive structural and functional resistance strategies act to prevent the pathogen from installing itself. Secondary metabolites and proteins secreted in the phylloplane have been identified as the chemical mediators that perform the plant's innate defense (Wagner 1991; Wagner et al. 2004; Shepherd et al. 2005; Shepherd and Wagner 2007; Sallets et al. 2014; Li et al. 2014; Sasse et al. 2016). Specifically, the phylloplanins of *Nicotiana tabacum* leaf wash are the first defense protein identified in the secretion of short glandular trichomes (Shepherd et al. 2005). The antifungal properties of this protein, highlighted in tobacco leaf wash, increase its role in the preinfection defense mechanism in other plants susceptible to fungal infections, such as *Theobroma cacao*.

T. cacao is an economically important plant because its beans are the raw material to produce chocolate (Judd et al. 2009). Fungal diseases represent a loss of around 40% of the economic potential of the tree *T. cacao* L. (World Cocoa Foundation, <http://www.worldcocoafoundation.org>). The fungus *Moniliophthora perniciosa* is the cause of witches' broom disease (Aime and Phillips-Mora 2005). The interaction of the fungus with the host begins with the adhesion of its basidiospores to the phylloplane, followed by germination of the basidiospore and the formation of the germ tube. The onset of infection is characterized by the penetration of the germ tube into the extracellular matrix of the plant and the development of primary hyphae in the apoplast (Figure 1B) (Frias et al. 1991; Sena et al. 2014). The germination of fungal spores is dependent on the activity of their preformed proteins (Oh et al. 2010; El-Akhal et al. 2013; Mares et al. 2016, 2017) (Figure 1A), and a favorable environment in the phylloplane of the host plant (Agrios 2005). The identification of preinfection biochemical mechanisms involved in the *T. cacao* – *M. perniciosa* interaction may be a new strategy to combat the pathogen, which prevents the installation of infection on the plant.

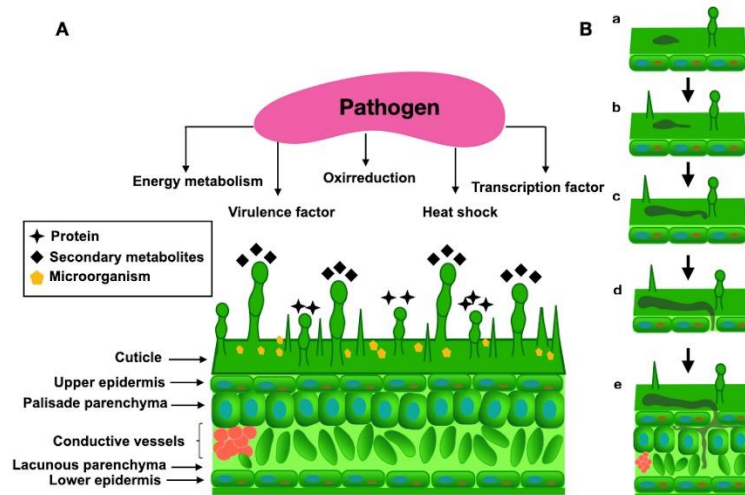


Figure 1: Preinfection mechanisms of the pathogen and phylloplane (A) The structural characteristics and functional aspects presents in phylloplane and preformed proteins in nongerminated spore. (B) The interaction of the fungal spore with the host: (a) adhesion of the nongerminated spore on the leaf surface, (b) spore with germ tube after 2 hours of germination, (c) spore with germ tube after 4 hours of germination and formation of the club shaped tip, (d) penetration of the germ tube after 6 hours of germination and (e) development of primary hyphae in the apoplast after 2 days of germination.

In this review, we explore the state of the art research regarding the biochemical mechanisms involved in the germination of fungal spores, the defense mechanisms in the phylloplane and the role of microorganisms residing in the phylloplane on these processes. We highlight the research associated with the preinfection mechanisms involved in the *T. cacao* – *M. perniciosa* interaction. Therefore, we provide a direction for future experimental investigations aimed at the development of technological strategies for the preventative control of diseases in cocoa crops.

2. The cocoa phylloplane, the first battlefield

The combat strategies available to control witches' broom disease and to rescue the economic potential of cocoa crops, where this disease occurs, are based on the development of resistant cocoa genotypes (Lopes et al. 2004; Silva et al. 2010; Pires et al. 2012). To achieve this, the genetic improvement program has considered factors such as improved seed yield and quality, genetic compatibility and selection of genes related to resistance and tolerance to pests and diseases (Lopes et al. 2011). However, the resistance shown by these clones has been overcome due to the adaptive evolution of the fungus *M. perniciosa* (Gramacho et al. 2016). On the other hand, evidence suggests that the cocoa phylloplane has structural and functional characteristics of a preinfection defense (Macagnan et al. 2009; Nyadanu et al. 2012; Almeida et al. 2017; Santana et al. 2018), which

can be explored to develop technologies that optimize a preventive defense of the plant itself and produce varieties with a higher level and durability of resistance. A plausible candidate for the biochemical mediation of this innate response is the phylloplanin protein (Shepherd et al. 2005; Shepherd and Wagner 2007; Freire et al. 2017).

In *T. cacao*, the amount of short glandular trichomes in the phylloplane is greater in a resistant genotype (CCN51) than in one susceptible (Catongo) to *M. pernicioso* infection (Almeida et al. 2017). This suggests a greater number of metabolites and proteins present in the phylloplane of these plants. In addition, the phylloplane of the resistant genotype (CCN51) shows genera of symbiotic bacteria exclusively with antiphytopathogenic action, such as *Stenotrophomonas*, *Lysobacter* and *Paenibacillus* (Santana et al. 2018). Actinomycetes of the genus *Streptomyces* have been shown to produce volatile compounds that inhibit the germination of *M. pernicioso* basidiospores in cocoa plants (Macagnan et al. 2009). On the other hand, the genotype susceptible to *M. pernicioso*, Catongo, shows genera of bacteria in the phylloplane that may be involved in the production of pigments that provide protection against UV light and regulation of stress, such as *Sphingomonas* (Santana et al. 2018). Favorable evidence of the participation of water-soluble compounds secreted in the cocoa phylloplane, as a defense mechanism against pathogens, is obtained by comparing plants irrigated in the soil and by sprinkler, prior to inoculation with the fungus *M. pernicioso*. In fact, the rate and severity of the disease are lower in plants irrigated in the soil than in plants irrigated by sprinkler. Leaf washing by sprinkler irrigation doubled the incidence in the susceptible genotype and tripled in the resistant genotype. This suggests that the chemical substances secreted on the leaf surface, by glandular trichomes and/or by symbiotic bacteria to the phylloplane, confer resistance to *M. pernicioso* (Almeida et al. 2017). Also, the antifungal activity in the cocoa leaf wash is evidenced by its ability to inhibit the germination of *M. pernicioso* spores (Almeida et al. 2017). In addition, the high level of epicuticular wax on the surface of cocoa leaves and fruits reduces infection caused by phytopathogens *Phytophthora palmivora* and *P. megakarya* (Nyadanu et al. 2012). This suggests that the cocoa phylloplane accumulates pre-existing compounds, proteins, microorganisms and morphological structures that affect the germination of the pathogen (Nyadanu et al. 2012; Almeida et al. 2017; Santana et al. 2018). Among the proteins involved in the defense of the phylloplane, there is phylloplanin (Shepherd et al. 2005).

Phylloplanin is the first defense protein, identified so far, secreted in the phylloplane. The activity of the T-phylloplanin gene promoter has been identified in short glandular trichomes of *N. tabacum*, which suggests that it is the secretory structure of this protein. Its antifungal action is demonstrated by inhibiting the germination of the *Peronospora tabacina* spore exposed to *N. tabacum* leaf wash. Interestingly, this antifungal effect is also evidenced by the exposure of the fungus to recombinant phylloplanin produced in a heterologous system (Shepherd et al. 2005). In addition, the antifungal effect of leaf washing on *P. tabacina* is not manifested by silencing the T-phylloplanin gene in a resistant tobacco variety, making it susceptible to disease. In this same work, the leaf wash of *Datura metel* and *Helianthus annuus* also inhibited germination of the phytopathogen and reduced leaf infection (Kroumova et al. 2007). However, these results are insufficient to attribute the antifungal effect observed specifically to phylloplanin. For this, investigations that use antibodies to neutralize the action

of phylloplanin or that carry out the sequencing of the protein, as well as silencing or overexpression of the gene are needed. The ability of phylloplanin in tobacco and sunflower phylloplane to prevent germination of fungal spores (Shepherd et al. 2005; Kroumova et al. 2007) raises the possibility of investigating this function about *M. pernicioso* in cocoa plants. The phylloplanin inhibitory activity on the germination of fungal spores is also expressed on *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum coccodes* and *Aspergillus fumigatus* (King et al. 2011; Mattupalli et al. 2014). This shows that phylloplanin has an effect against a broad spectrum of fungi, which favors the idea of exploring its potential in plant breeding strategies aimed at preinfection control against witches' broom disease in cocoa crops. In fact, phylloplanin has an antimicrobial property, which demonstrates a biotechnological potential in the control of fungal plant diseases, as well as human and animal mycoses. However, exogenous phylloplanin administration routes may not be economically viable ways of combat (King et al. 2011). On the other hand, strategies to stimulate the endogenous production of phylloplanin in plants have also been proposed to explore its antifungal potential. For this, it is necessary to introduce the gene through genetic transformation of plants. Tobacco plants susceptible to *P. tabacina* were transformed with the T-phylloplanin gene directed towards the apoplast. This showed that the overexpression of this gene in tobacco plants confers resistance against the pathogen *P. tabacina* (Kroumova et al. 2013). In addition, the introduction of the synthetic phylloplanin gene in *N. tabacum* also provides immunity to plants previously susceptible to infection by *P. tabacina* (Sahoo et al. 2014).

Proteins were identified in the leaf wash of a CCN51 cacao genotype resistant to *M. pernicioso*, using the 2D SDS-PAGE technique. The same quantity of leaves of the susceptible Catongo genotype was analyzed, but there was no protein yield. Of the 71 total spots detected, 42.4% plant proteins, and 19.7% bacteria involved in defense, metabolite synthesis and nucleic acid metabolism were identified (Almeida et al. 2017). Effectively, 37.9% of the spots detected in the 2D gel did not have their proteins identified due to the inherent limitation of the technique. The homologous phylloplanin to tobacco T-phylloplanin seems little abundant in cocoa phylloplane and can be part of this percentage. Interestingly, the cocoa leaf wash has an inhibitory effect on the germination of *M. pernicioso* spores, which suggests two possible hypotheses. First, the techniques used to detect phylloplanin in cocoa leaf wash were not sufficiently accurate. Second, in the cocoa phylloplane the innate preinfection defense may not have phylloplanin as the main molecule. Although this defense protein has not yet been detected in the 2D gel of the cocoa phylloplane, it has already been identified in the EST database of whole seedlings of the ICS1 genotype of *T. cacao*, a sequence that supposedly encodes the cocoa phylloplanin (Argout et al. 2008).

The first characterization of *Tcphyll*, the cocoa phylloplanin gene, was performed in silico. The ORF of 477 bp encodes a predicted protein of 158 amino acid residues with a molecular weight of 16 kDa (Freire et al. 2017). This protein has 43% identity with the phylloplanin identified in the tobacco phylloplane (Shepherd et al. 2005; Kroumova et al. 2007). The predicted protein has signal peptide and possible glycosylation and phosphorylation sites. Such post-translational modifications and the similarity with tobacco's phylloplanin suggest that it is phylloplanin. In addition, a generated dendrogram shows that the cocoa phylloplanin-like, despite showing similarity with an allergenic protein, due to the presence of the Ole e 1 domain, is grouped with proteins similar to phylloplanin.

In fact, phylloplanins have four conserved cysteine residues (Freire et al. 2017), while allergenic proteins have six residues that are considered fundamental in stabilizing the allergenic structure (Villalba et al. 1994; Gonzalez et al. 2000). The expression of the cocoa phylloplanin transcript was analyzed in different plant tissues. Expression analysis via qRT-PCR (Polymerase chain reaction quantitative real time) shows that the *Tcphyll* transcript accumulates in different tissues of the resistant cocoa variety (Freire et al. 2017). In fact, phylloplanin is most often seen as a constitutively secreted phylloplane protein (Shepherd et al. 2005). However, cocoa plants inoculated with *M. pernicioso* showed an increase in the level of their transcripts in infected meristematic tissues. Specifically, early in the infection, an increase in expression occurred, followed by a decrease. Subsequently, in the transition period of the disease from the biotrophic to the saprophytic phase (45 days after infection), a higher level of transcripts was again noted. This suggests that phylloplanin may also act in the defense response induced by biotic stress (Freire et al. 2017). In addition, the *Tcphyll* promoter drives GUS expression in short glandular trichomes in transgenic tobacco plants similar to the tobacco T-phylloplanin gene promoter (Shepherd et al. 2005). In transformed plants, the relative expression of the *Tcphyll* GUS-promoter also occurs in different tissues, such as meristem, young leaf, stem and root (Freire et al. 2017). Thus, the antifungal effect of a possible phylloplanin in the cocoa phylloplane as an innate preinfection defense factor in the fight against *M. pernicioso* infection has not yet been clarified.

Some routes can be explored experimentally to verify the potential of the phylloplane as the battlefield where the cacao tree must win the war against the witches' broom disease. Initially, the expression of the phylloplanin in different tissues of the cocoa leaf structure should be investigated with highly accurate techniques, such as specific antibody production and Western blotting. These data will provide evidence on where the highest level of accumulation of phylloplanin protein occurs in cocoa. Another possibility is to develop a phylogenetic analysis with plant phylloplanin sequences deposited on GenBank, to understand whether there was any selective pressure that provided expression in subepidermal tissues of cocoa (Freire et al. 2017). In parallel, we have developed the characterization of this protein by expression in a heterologous system to subsequently perform functional bioassays. For this, a synthetic ORF with optimized codons for bacterial expression was inserted into the vectors pET-28a and pMAL-c2x. In addition to using these different vectors, four strains of *Escherichia coli* - *Rosetta (DE3)*, *BL21 (DE3) pLysS*, *C41 (DE3)* and *C43 (DE3)* were transformed and tested for protein expression. The expression test at different concentrations of IPTG and temperature levels did not show accumulation of TcPHYLL in *E. coli* extracts (Unpublished results). The protein did not accumulate in the bacterial extracts even with the use of a vector with fusion protein (pMAL-c2x) and cells specialized for toxic protein, *C41 (DE3)* and *C43 (DE3)* (Miroux and Walker 1996).

Despite not knowing whether *T. cacao*'s phylloplanin acts on the plant's initial defense mechanism, it is already known that the cocoa phylloplane is influenced by physical factors, preformed water-soluble compounds and pre-existing morphological structures, as well as by microorganisms present in this region (Figure 2). All of these participate in the preinfection mechanism of the plant and can contribute to prevent the germination of pathogenic fungi. Therefore, the cocoa phylloplane is the first battleground, where the plant's innate defense acts

to prevent the pathogen from causing infection. Finally, we will explore in the next topic the processes related to the germination of fungal spores, to identify points where it is possible to inhibit the initial germinative development signaling pathways of the phytopathogenic fungus.

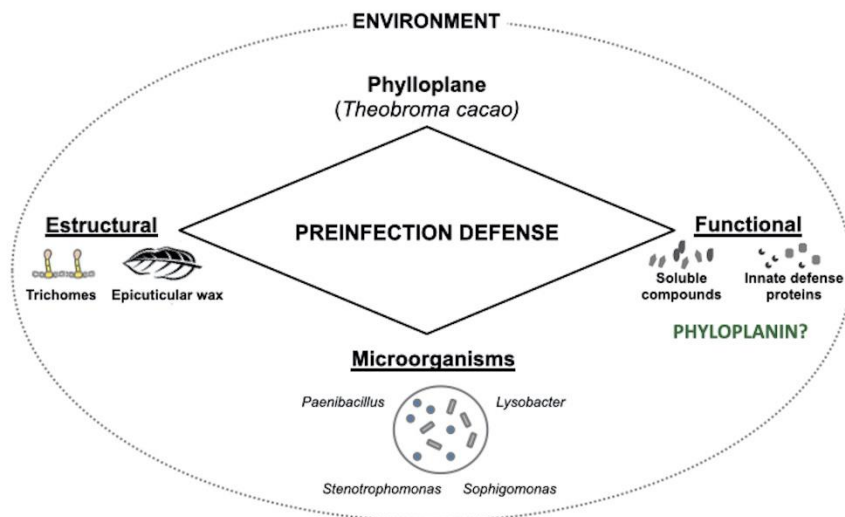


Figura 2: Preinfection defense of the *Theobroma cacao* phylloplane.

3. Germination of fungal spores: initial stage of disease establishment

Defense strategies for *T. cacao* against the fungus *M. perniciosa* may be proposed based on the identification of the role of phylloplane chemical mediators in signaling pathways underlying the germination of fungal spores. The germination of fungal spores is dependent on specific protein activity at different stages of the process (Mares et al. 2016, 2017). Specifically, energy metabolism, heat shock, transcription and synthesis proteins are crucial in the early stages of germination (Oh et al. 2010; El-Akhal et al. 2013; González-Rodríguez et al. 2015; Mares et al. 2016, 2017). In *M. perniciosa*, nongerminated basidiospores have proteins involved in the stress response, as well as proteins with a pathogenic function related to the metabolic processes of lipids, carbohydrates and proteins (Mares et al. 2016, 2017). Also, proteins related to the invasive development of hypha that are fundamental to trigger spore germination on the plant's surface (Mares et al. 2016). On the other hand, primary hyphae (2 hours after germination) induce redox proteins that can provide detoxification of free radicals inside the germ tube. Hypha growth is correlated with the expression of proteins involved in energy metabolism and proteins related to the fungus filamentation that are induced in basidiospores after 4 h of germination (Mares et al. 2017). Indeed, a major challenge at the basic and applied levels of research on the interaction between *M. perniciosa* and *T. cacao* is to identify the mechanism by which chemical mediators in the phylloplane can influence fungal spore germination. Also, in which stage of the signaling cascade germination is likely to be inhibited. Understanding these specificities creates favorable perspectives for developing a tool that enhances the performance of this inhibitory factor of the

phylloplane. This can enable an efficient preinfection defense of cacao against witches' broom disease.

The fungus *M. pernicios*a begins its life cycle with the germination of basidiospores on the surface of young aerial organs, such as fruits, buds, floral pads and cocoa leaves (Evans et al. 1978, 2002; Evans 1981; Purdy and Schmidt 1996) (Figure 1B). Spore germination is a fundamental physiological mechanism for the development of the fungus and the onset of infection. The activation of nongerminated spores triggers metabolic activity, inducing the growth and formation of the germ tube (Schmit and Brody 1976; Bonnen and Brambl 1983; D'Enfert 1997). This event is essential for the establishment of the disease since the infective structure of the pathogen encounters the phylloplane of the host plant (Agrios 2005). The regulatory mechanism of fungal spore germination, the development of the infective structure required for penetration into the host and the process of perception of the plant surface by the pathogen involves activation of specific signaling pathways in different fungi (D'Enfert 1997; Oshero

rov and May 2000; Takano et al. 2000; Agrios 2005; Kou and Naqvi 2016). The signaling cascade via ras-dependent mitogen-activated protein kinase (MAPK / ras) is involved in the germination of *Saccharomyces cerevisiae* spores (Herman and Rine 1997), *Aspergillus nidulans* (Oshero

rov and May 2000) and *Arthrotrichy oligospora* (Liu et al. 2018). In *Aspergillus flavus*, germination is dependent on signaling via MAPK (Tiawari et al. 2016). In *Fusarium solani* germination, signaling is mediated by cAMP-dependent protein kinase (PKA/cAMP) (Ruan et al. 1995). Finally, in *Colletotrichum gloeosporioides* germination occurs through the calmodulin/Ca²⁺ pathway (Kim and Kolattukud 1998). The signaling pathway underlying the germination of *M. pernicios*a represents an important knowledge gap. Knowing the mechanisms of this pathway can contribute to investigating how the chemical mediators of the phylloplane can cause an inhibitory effect on the respective pathway. Also, genetic engineering approaches could develop cocoa genotypes that overexpress defense proteins capable of effectively inhibiting the germination of *M. pernicios*a basidiospores.

The proteomic approach contributed mainly to identify the specific proteins correlated with each phase of the *M. pernicios*a germination process (Mares et al. 2016, 2017). However, only one study has investigated the influence of leaf washing on resistant (CCN51) and susceptible (Catongo) cocoa genotypes on the germination of basidiospores of *M. pernicios*a (Mares et al. 2020). The germination level was lower in the fungus exposed to leaf wash of the resistant genotype. Furthermore, proteins associated with virulence, such as glycoside hydrolase and MFS multidrug transporter, were expressed exclusively in the germinated basidiospores of *M. pernicios*a exposed to the leaf wash of the resistant genotype. On the other hand, *M. pernicios*a basidiospores exposed to leaf wash of the susceptible genotype expressed immune response proteins (Mares et al. 2020). Interestingly, the germination of the basidiospores is correlated with the overexpression of different proteins when exposed to the leaf wash of resistant or susceptible genotypes. Proteins specifically expressed in *M. pernicios*a basidiospores germinated in leaf wash of the resistant genotype may have been induced due to the differential substances secreted. The identification of chemical mediators in the phylloplane that prevent the expression of virulence-related proteins seems to be a good starting point to establish an effective preinfection defense in cocoa.

The water-soluble components of the cocoa leaf wash induce the fermentative pathway in the spores of *M. pernicioso* at the beginning of germination (Mares et al. 2020). Specifically, alcohol dehydrogenase (ADH), an enzyme that participates in the fermentation pathway, was detected exclusively in germinated basidiospores exposed to cocoa leaf washing by Western blot (Mares et al. 2020). This seems to prepare the primary hyphae for its establishment in the intercellular space at the beginning of the parasitic phase of the disease (Ceita et al. 2007). Electron micrographs show that hyphae are scarce in the parasitic phase and that they are surrounded by a thick layer of electron-dense material (Sena et al. 2014; Teixeira et al. 2014), which can hinder the diffusion of oxygen into the interior of the hypha. Thus, the accumulation of ADH can facilitate the obtaining of energy by anaerobic route by hyphae in the initial phase of the disease. In addition, catalase, a protein involved in the oxidoreduction process, has a greater expression in the basidiospores germinated in the cocoa leaf wash of the two varieties in relation to the control. This shows that the leaf surface of cocoa has defense-eliciting substances, such as reactive oxygen species (ROS). Chaperone binding immunoglobulin protein (BiP) increases expression in germinated basidiospores only in the resistant cocoa leaf wash (Mares et al. 2020), indicating the occurrence of stress at the level of the endoplasmic reticulum.

In conclusion, we believe that inhibiting and/or disturbing the processes that trigger the onset of fungal spore germination is an alternative with the potential to develop preinfection control strategies for cocoa plants against witches' broom disease. The experimental challenges to investigate this hypothesis involve the consistent identification of the role of chemical mediators that participate in the phylloplane defense of specific proteins in the germination process, and their signaling pathways. With this, we can establish how the defense mechanisms of the phylloplane act to inhibit the pathways involved at the beginning of germination. Therefore, we emphasize the importance of this research as the path to be taken to visualize new solutions to solve old problems.

Acknowledgments

We thank João Zugaib for comments on the manuscript.

Formatting of funding sources

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (0001) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) (303765/2019-4).

Author Contribution Statement

M.Zugaib: design of the manuscript;

C.P. Pirovani: critically reviewed of the manuscript;

M.R. Santana: production of figures and comments on the manuscript;

M. Macedo: production of figures and comments on the manuscript.

Competing financial interests:

The authors declare that there are no competing financial interests.

References

Agrios, G.N., 2005. Plant Pathology, fifth ed. San Diego, Elsevier Academic Press.

Aime, M.C., Phillips-Mora, W., 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97, 1012-1022.

Almeida, D.S.M., Gramacho, K.P., Cardoso, T.H.S., Micheli, F., Alvim, F.C., Pirovani, C.P., 2017. Cacao phylloplane: the first battlefield against *Moniliophthora perniciosa*, which causes witches' broom disease. *Phytopathology* 102, 864-871.

Argout, X., Fouet, O., Wincker, P., Gramacho, K.P., Legavre, T., Sabau, X., Risterucci, A.M., Da Silva, C., Cascardo, J., Allegre, M., Kuhn, D., Verica, J., Courtois, B., Loor, G., Babin, R., Sounigo, O., Ducamp, M., Gultinan, M.J., Ruiz, M., Alemanno, L., Machado, R., Phillips, W., Schnell, R., Gilmour, M., Rosenquist, E., Butler, D., Maximova, S., Lanaud, C., 2008. 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* 9, 512.

Bonnen, A., Brambl, R., 1983. Germination Physiology of *Neurospora crassa* Conidia. *Experimental Mycology* 7, 197-207.

Bringel, F., Couée, I., 2015. Pivotal roles of phyllosphere microorganisms at the interface between plant functioning and atmospheric trace gas dynamics. *Frontiers Microbiology* 6, 486.

Ceita, G.O., Macêdo, J.N.A., Santos, T.B., Alemanno, L., Gesteira, A.S., Micheli, F., Mariano, A.C., Gramacho, K.P., Silva, D.C., Meinhardt, L., Mazzafera, P., Pereira, G.A.G., Cascardo, J.C.M., 2007. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Crinipellis perniciosa*. *Plant Science* 173, 106-117.

D'Enfert, C., 1997. Fungal spore germination: insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Biology* 21, 163-172.

El-Akhal, M.R., Colby, T., Cantoral, J.M., Harzen, A., Schmidt, J., Fernández-Acero, F.J., 2013. Proteomic analysis of conidia germination in *Colletotrichum acutatum*. *Archives Microbiology* 195, 227-246.

Evans, H.C., Stalpers, J.A., Samson, R.A., Benny, G.L., 1978. On the taxonomy of *Monilia*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Canadian Journal of Botany* 56, 2528-2532.

Evans, H., 1981. Witches' broom disease - a case study. *Cocoa Growers' Bull* 32, 5-19.

Evans, H.C., Holmes, K.A., Phillips, W., Wilkinson, M.J., 2002. What's in a name: *Crinipellis*, the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cocoa? *Mycologist* 16, 148-152.

Freire, L.S., Santana, J.O., Souza, A.O., Santos, J.B., Oliveira, I.B., Alvim, F.C., Gramacho, K.P., Costa, M.G.C., Pirovani, C.P., 2017. TcPHYLL, a cacao phylloplanin expressed in young tissues and glandular trichomes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 100, 126-135.

Frias, G.A., Purdy, L.H., Schmidt, R.A., 1991. Infection biology of *Crinipellis pernicioso* on vegetative flushes cacao. *Plant Disease* 75, 552-556.

Gonzalez, E., Monsalve, R.I., Puente, X.S., Villalba, M., Rodríguez, R., 2000. Assignment of the disulfide bonds of Ole e 1, a major allergen of olive tree pollen involved in fertilization. *The Journal of Peptide Research*, 55, 18-23.

González-Rodríguez, V.E., Lineiro, E., Colby, T., Harzen, A., Garrido, C., Cantoral, J.M., Schmidt, J., Fernández-Acero, F.J., 2015. Proteomic profiling of *Botrytis cinerea* conidial germination. *Archives Microbiology* 197, 117-133.

Gramacho, K.P., Luz, E.D.M.N., Silva, F.S., Lopes, U.V., Pires, J.L., Pereira, L., 2016. Pathogenic variability of *Moniliophthora pernicioso* in three agroecological zones of the cacao region of Bahia, Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 16, 7-13.

Herman, P.K., Rine, J., 1997. Yeast spore germination: a requirement for Ras protein activity during re-entry into the cell cycle. *EMBO Journal* 16, 6171-6181.

Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., Donoghue, M.J., 2009. *Sistemática vegetal: um enfoque filogenético*. Tradução André Olmos Simões et al., third ed. Porto Alegre, Artmed.

Kim, Y., Kolattukud, P.E., 1998. Induction of Ca²⁺-Calmodulin Signaling by Hard-Surface Contact Primes *Colletotrichum gloeosporioides* Conidia to Germinate and Form Appressoria. *Journal of Bacteriology* 180, 5144-5150.

King, B., Williams, D.W., Wagner, G.J., 2011. Phylloplanins Reduce the Severity of Gray Leaf Spot and Brown Patch Diseases on Turfgrasses. *Crop Science* 51, 2829-2839.

Kou, Y., Naqvi, N.I. 2016. Surface sensing and signaling networks in plant pathogenic fungi. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 57, 84-92.

Kroumova, A.B., Shepherd, R.W., Wagner, G.J., 2007. Impacts of T-Phylloplanin Gene Knockdown and of *Helianthus* and *Datura Phylloplanins* on *Peronospora tabacina* Spore Germination and Disease Potential. *Plant Physiology* 144, 1843–1851.

Kroumova, A.B.M., Sahoo, D.K., Raha, S., Goodin, M., Maiti, I.B., Wagner, G.J. 2013. Expression of an Apoplast-Directed, T-Phylloplanin-GFP Fusion Gene

Confers Resistance against *Peronospora tabacina* Disease in a Susceptible Tobacco. *Plant Cell Reports* 32, 1771-1782.

Li, C.H., Liu, Y., Hua, J., Luo, S.H., Li, S.H., 2014. Peltate glandular trichomes of *Colquhounia seguinii* harbor new defensive clerodane diterpenoids. *Journal of Integrative Plant Biology* 56, 928–940.

Lindow, S.E., Leveau, J.H.J., 2002. Phyllosphere microbiology. *Environmental Biotechnology* 13, 238-243.

Liu, T., Tian, D.W., Zou, L.J., Liu, F.Y., Can, Q.Y., Yang, J.K., Xu, J.P., Huang, X.W., Xi, J.Q., Zhu, M.L., Mo, M.H., Zhang, K.Q., 2018. Quantitative proteomics revealed partial fungistatic mechanism of ammonia against conidial germination of nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* ATCC24927. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 98, 104–112.

Lopes, U.V., Monteiro, W.R., Pires, J.L., Rocha, J.B., Pinto, L.R.M., 2004. On farm selection for witches' broom resistance in bahia, brazil- a historical retrospective. *Agrotópica* 16, 61 - 66.

Lopes, U.V., Monteiro, W.R., Pires, J.L., Clement, D., Yamada, M.M., Gramacho, K.P. 2011. Cacao breeding in Bahia, Brazil - strategies and results. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 11, 73-81.

Macagnan, D., Romeiro, R.S., Pomella, A.W.V., 2009. Inibição da germinação de basidiósporos de *Crinipellis pernicioso* por compostos voláteis produzidos por cinco actinomicetos residentes de filoplano de cacauero. *Summa Phytopathologica* 35, 140-142.

Mares, J.H., Gramacho, K.P., Santos, E.C., Santiago, A.S., Silva, E.M.A., Alvim, F.C., Pirovani, C.P., 2016. Protein profile and protein interaction network of *Moniliophthora pernicioso* basidiospores. *BMC Microbiology* 16, 120.

Mares, J.H., Gramacho, K.P., Santos, E.C., Santiago, A.S., Oliveira, J.S., Sousa, A.O., Alvim, F.C., Pirovani, C.P., 2017. Proteomic analysis during of spore germination of *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease in cacao. *BMC Microbiology* 17, 176.

Mares, J.H., Gramacho, K.P., Santana, J.O., Souza, A.O., Alvim, F.C., Pirovani, C.P. 2020. Hydrosoluble phylloplane components of *Theobroma cacao* modulate the metabolism of *Moniliophthora pernicioso* spores during germination. *Fungal Biology* 124, 73-81.

Mattupalli, C., Spraker, J.E., Berthier, E., Charkowski, A.O., Keller, N.P., Shepherd, R.W., 2014. A microfluidic assay for identifying differential responses of plant and human fungal pathogens to tobacco phytoalexins. *Plant Health Progress* 15, 130-134.

Miroux, B., Walker, J.E., 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology* 260, 289–298.

Nyadanu, D., Akromah, R., Adomako, B., Kwoseh, C., Dzahini-Ob, H., Lowor, S.T., Akrofi, A.Y., Assuah, M.K., 2012. Host plant resistance to *Phytophthora* pod rot in cacao (*Theobroma cacao* L.): The role of epicuticular wax on pod leaf surfaces. *International Journal of Botany* 8, 13-21.

Oh, T.Y., Ahn, C., Kim, J.G., Ro, H., Lee, C., Kim, J.W. 2010. Proteomic analysis of early phase of conidia germination in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* 47, 246–253.

Osherov, N., May, G., 2000. Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis. *Genetics* 155, 647-656.

Pereira, J.L., Ram, A., Figueredo, J.M., Almeida, L.C.C., 1989. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. *Agrotrópica* 1, 79–81.

Pires, J.L., de Melo, G.P., Yamada, M.M., Gramacho, K.P., 2012. Association among sources of resistance to witches' broom disease for the increment of the level and durability of the character. *Agratópica* 24, 27-30.

Purdy, L.H., Schmidt, R., 1996. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. *Annual Review of Phytopathology* 34, 573–94.

Remus-Emsermann, M.N.P., Lücker, S., Müller, D.B., Potthoff, E., Daims, H., Vorholt, J.A., 2014. Spatial distribution analyses of natural phyllosphere colonizing bacteria on *Arabidopsis thaliana* revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Environmental Microbiology* 16, 2329–2340.

Ruan, Y., Kotraiah, V., Straney, D.C. 1995. Flavonoids stimulate germination in *Fusarium solani* pathogenic on legumes in a manner sensitive to inhibitors of cAMP-dependent protein kinase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8, 929-938.

Sahoo, D.K., Raha, S., Hall, J.T., Maiti, I.B. 2014. Overexpression of the Synthetic Chimeric Native-T-Phylloplanin-GFP Genes Optimized for Monocot and Dicot Plants Renders Enhanced Resistance to Blue Mold Disease in Tobacco (*N. tabacum* L). *The Scientific World Journal* 2014, 1-12.

Sallets, A., Beyaert, M., Boutry, M., Champagne, A., 2014. Comparative proteomics of short and tall glandular trichomes of *Nicotiana tabacum* reveals differential metabolic activities. *Journal of Proteome Research* 13, 3386-3396.

Santana, J.O., Gramacho, K.P., Ferreira, K.T.S.E., Rezende, R. P., Mangabeira, P.A.O., Dias, R.P.M., Couto, F.M., Pirovani, C.P., 2018. Witches' broom resistant genotype CCN51 shows greater diversity of symbiont bacteria in its phylloplane than susceptible genotype catongo. *BMC Microbiology* 18, 194.

Sasse, J., Schlegel, M., Borghi, L., Ullrich, F., Lee, M., Liu, G.W., Giner, J.L., Kayser, O., Bigler, L., Martinoia, E., Kretschmar, T., 2016. *Petunia hybrida* PDR2 is involved in herbivore defense by controlling steroidal contents in trichomes. *Plant, Cell & Environment* 36, 2725-2739.

Schmit, J.C., Brody, S., 1976. Biochemical Genetics of *Neurospora crassa* Conidial Germination. *Bacteriological Reviews* 40, 1-41.

Sena, K., Alemanno, L., Gramacho, K.P., 2014. The infection process of *Moniliophthora perniciosa* in cacao. *Plant Pathology* 63, 1272-1281.

Shepherd, R.W., Bass, W.T., Houtz, R.L., Wagner, G.J. 2005. Phylloplanins of tobacco are defensive proteins deployed on serial surfaces by short glandular trichomes. *Plant Cell* 17, 1851-1861.

Shepherd, R.W., Wagner, G.J. 2007. Phyloplane proteins: emerging defenses at the aerial frontline? *Trends in Plant Science* 12, 1360-1385.

Silva, S.D.V.M., Luz, E.D.M.N., Pires, J.L., Yamada, M.M., Filho, L.P.S., 2010. Parent selection for cocoa resistance to witches'-broom. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45, 680-685.

Takano, Y., Kikuchi, T., Kubo, Y., Hamer, J.E., Mise, K., Furusawa, I. 2000. The *Colletotrichum lagenarium* MAP Kinase Gene CMK1 Regulates Diverse Aspects of Fungal Pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 374-383.

Teixeira, J.P.L., Thomazella, D.P.T., Reis, O., do Padro, P.F.V., do Rio, M.C.S., Fiorin, G.L., José, J., Costa, G.G.L., Negri, V.A., Mondengo, J.M.C., Mieczkowski, P., Pereira, G.A.G., 2014. High-Resolution Transcript Profiling of the Atypical Biotrophic Interaction between *Theobroma cacao* and the Fungal Pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *The Plant Cell* 26, 4245-4269.

Tiwari, S., Thakur, R., Goel, G., Shankar, J., 2016. Nano-LC-Q-TOF Analysis of Proteome Revealed Germination of *Aspergillus flavus* Conidia is Accompanied by MAPK Signalling and Cell Wall Modulation. *Mycopathologia* 181, 769–786.

Villalba, M., Batanero, E., Monsalve, R.I., De la peña, M.A.G., Lahoz, C., Rodriguez, R., 1994. Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 15217-15222.

Wagner, G.J., 1991. Secreting Glandular Trichomes: More than Just Hairs. *Plant Physiology* 96: 675-679.

Wagner, G.J., Wang, E., Shepherd, R.W., 2004. New Approaches for Studying and Exploiting an Old Protuberance, the Plant Trichome. *Annals of Botany* 93: 3-11.

CAPÍTULO 2

Caracterização da filoplanina de *Theobroma cacao* por expressão em sistema heterólogo

Resumo

A filoplanina é uma proteína de defesa, presente na superfície foliar de tabaco, que apresenta ação inibitória contra fitopatógeno. Esta proteína possui também um potencial biotecnológico que pode ser explorado na indústria agrícola e farmacêutica. Embora a filoplanina ainda não tenha sido identificada no filoplano do cacau, estudos com seus transcritos já foram realizados. Porém, ainda não têm pesquisas sobre a função desta proteína. Desta maneira, o objetivo do trabalho é identificar qual a região funcional da filoplanina do cacau, TcPHYLL, por meio da expressão em sistema heterólogo em *Escherichia coli*. Para isto, quatro versões de ORF's sintéticas da filoplanina do cacau para expressão em bactéria foram produzidas: (i) ORF completa (TcPHYLL^{Q25-T158}) com cauda de histidina (His-Tag) no terminal amino, inseridas nos sítios NdeI/XhoI do vetor pET28a; (ii) ORF completa (TcPHYLL^{Q25-T158}) com domínio de ligação à maltose (MBP) fundido no terminal amino e His-Tag na extremidade carboxi inseridas no vetor pMAL-c2x; (iii) versão truncada (TcPHYLL^{Q25-V99}) com MBP fundido no N-terminal e His-Tag na C-terminal, inserida no vetor pMAL-c2x e; (iv) versão truncada (TcPHYLL^{Q84-T158}) com MBP fundido no N-terminal e His-Tag na C-terminal, inserida no vetor pMAL-c5x. A transformação por choque térmico foi realizada em quatro estirpes de *E. coli* e o teste de expressão foi feito em diferentes concentrações de IPTG e temperaturas. O alinhamento de TcPHYLL com outras sequências, bem como a construção de um modelo tridimensional TcPHYLL foram realizados. A versão truncada da filoplanina com a eliminação da maior parte do domínio tipo Ole e 1 (TcPHYLL^{Q84-T158}) em fusão com o

domínio de ligação à maltose derivado do vetor, é expressa eficientemente na fração solúvel e insolúvel do extrato bacteriano. Isto sugere que a filoplanina do cacau é tóxica a *E. coli*. Assim, a região carboxi não funcional da proteína foi utilizada como um imunógeno para produção de anticorpos policlonais em camundongos. Diante dos resultados, o domínio tipo Ole e 1 presente na filoplanina pode ser a região funcional da proteína. Os anticorpos policlonais produzidos podem ser utilizados em estudos funcionais da proteína no patossistema. Com isso, abrimos possibilidades para a produção de peptídeos funcionais de tamanho reduzido a partir de versões truncadas da filoplanina, para fins biotecnológicos. Isso deixa claro a necessidade de desenvolver mais estudos moleculares, bioquímicos e funcionais com a filoplanina do cacau.

1. Introdução

A filoplanina é uma glicoproteína secretada por tricomas glandulares curtos presentes no filoplano, que atua na defesa inicial da planta (SHEPHERD et al., 2005; SHEPHERD & WAGNER, 2007; FREIRE et al., 2017). Em lavado foliar de *Nicotiana tabacum*, a filoplanina inibe a germinação do fitopatógeno *Peronospora tabacina* (SHEPHERD et al., 2005). A superexpressão do gene *T-phyloplanin* em plantas de tabaco suscetíveis à *P. tabacina* confere resistência ao patógeno (KROUMOVA et al., 2013). Em plantas transgênicas de *N. tabacum* cv. KY14, contendo o gene T-filoplanina sintético, também apresenta essa característica (SAHOO et al., 2014). Ainda, a propriedade antifúngica da filoplanina do tabaco sobre a germinação de esporos fúngicos também se expressa sobre outros patógenos, como *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum coccodes*, *Aspergillus fumigatus* (KING et al., 2011; MATTUPALLI et al., 2014). No entanto, a função desta proteína em outras plantas ainda não está confirmada. Assim, a atividade antifúngica da filoplanina do tabaco desperta interesse em realizar estudos funcionais da proteína em plantas suscetíveis à fungos fitopatógenos.

Theobroma cacao é uma planta com importância econômica e ambiental (JUDD et al., 2009; EVANS, 2007), severamente afetada por doenças fúngicas (EVANS, 1981a; MEINHARDT et al., 2008). Dentre estas, encontra-se a vassoura-de-bruxa e a monilíase, as quais são causadas pelos fungos

Moniliophthora perniciosa e *M. royeri*, respectivamente (FULTON, 1989; GRIFFITH, 2003; AIME & PHILLIPS-MORA, 2005). Estes fungos iniciam a germinação de seus esporos no filoplano do cacau, o qual possui presença de microrganismos (SANTANA et al., 2018), estruturas morfológicas pré-existentes (NYADANU et al., 2012; ALMEIDA et al., 2017), metabólitos secundários e proteínas secretadas (ALMEIDA et al., 2017) que participam da primeira linha de defesa da planta (AGRIOS, 2005; SHEPHERD et al., 2005; SHEPHERD & WAGNER, 2007). A filoplanina pode ser uma proteína potencial para o controle da vassoura-de-bruxa. A caracterização *in silico* do seu gene (*Tcphyll*) revela propriedades estruturais importantes da proteína (FREIRE et al., 2017). A filoplanina do cacau, embora apresente um domínio tipo Ole e 1 de proteína alergênica, é filogeneticamente similar à filoplanina de outras plantas, possuindo quatro resíduos conservados de cisteína (FREIRE et al., 2017), enquanto as proteínas alergênicas do pólen possuem seis resíduos de cisteína conservados (VILLALBA et al. 1994; GONZALEZ et al. 2000). Estes seis resíduos de cisteínas da proteína alergênica de pólen de *Olea europaea* (Ole e 1) estão ligados por pontes dissulfetos (VILLALBA et al. 1994; GONZALEZ et al. 2000), que é uma característica importante para a estabilidade conformacional da proteína e, conseqüentemente, para sua função (GEHRMANN et al., 1998; KAVODSZKY et al., 2000). Ole e 1 tratado com TFMS (ácido trifluorometanossulfônico) perdeu a capacidade alergênica devido a alteração na conformação da proteína (BATANERO et al., 1994). A ligação de dissulfeto é fundamental para classificar a família das proteínas inibidoras de protease (LASKOWSKI et al., 1980 apud GONZALEZ et al. 2000). Assim, o arranjo de dissulfeto das proteínas alergênicas de pólen podem estar relacionados com esta função (GONZALEZ et al. 2000).

Os transcritos de filoplanina são detectados em diferentes tecidos e órgãos de cacau, bem como a atividade do seu promotor em plantas transgênicas de tabaco (FREIRE et al., 2017). No entanto, ainda não está claro qual é a função da filoplanina do cacau. A identificação da possível região funcional é fundamental para a compreensão do efeito desta proteína sobre a germinação de *M. perniciosa* e *M. royeri* em plantas de cacau. Estudos sobre análise estrutural e funcional podem ser desenvolvidos utilizando a expressão da proteína por meio de sistema heterólogo em procarioto (KAUR et al., 2018).

O sistema de expressão em *Escherichia coli* é o mais utilizado para produção de grande quantidade de proteínas recombinantes. Esse organismo possui uma maquinaria simples, o que proporciona rápido crescimento celular e, conseqüentemente, alto rendimento de proteína. Além disso, este sistema heterólogo apresenta baixo custo (HOCKNEY, 1994; SORENSEN & MORTENSEN, 2005; KAUR et al., 2018). Apesar das qualidades do sistema de expressão em *E. coli*, ainda há desafios a serem superados. A produção de proteínas complexas, tóxicas ou de membranas pode apresentar limitações neste tipo de sistema, diminuindo sua capacidade de expressão (STUDIER et al., 1990; MIROUX & WALKER; 1996; DUMON-SEIGNOVERT et al., 2004; KIMELMAN et al., 2012). Dessa forma, é necessário ampliar o conhecimento sobre os elementos básicos e os fatores que interferem na produção de proteínas recombinantes. Assim, podemos estabelecer estratégias para aperfeiçoar este sistema de expressão, o que vai maximizar o rendimento proteico.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar a região funcional da filoplanina do cacau. Para isto nós realizamos a expressão de quatro versões da filoplanina do cacau, envolvendo três vetores de expressão, utilizando quatro tipos de estirpes de *E. coli* e diferentes condições de temperatura e indução. Os resultados apresentados mostram que o sistema de expressão em *E. coli* não é eficiente para expressar a filoplanina do cacau em sua versão inteira. Por outro lado, esses ensaios indicam que o domínio tipo Ole e 1 presente na filoplanina pode ser a região funcional da proteína.

2. Material e Métodos

2.1 Análises *in vitro*

2.1.1 Transformação bacteriana para a obtenção da proteína TcPHYLL

As versões das ORFs sintéticas com códons otimizados para expressão em *E. coli* foram produzidas pela FastBio. A ORF sintética com 474 pb (XP_007035626.2), codificando uma proteína predita de 158 resíduos de aminoácidos (TcPHYLL^{Q25-T158}), com cauda de histidina (His-Tag) no terminal

amino foi inserida nos sítios NdeI/XhoI do vetor pET28a (Figura 1A e 2). A ORF completa (TcPHYLL^{Q25-T158}) (Figura 1B e 2), bem como a versão truncada TcPHYLL^{Q25-V99} (Figura 1C e 2), com domínio de ligação à maltose (MBP) fundido no terminal amino e His-Tag na extremidade carboxi foram inseridas nos sítios EcoRI/SalI do vetor pMAL-c2x. A versão truncada TcPHYLL^{Q84-T158} (Figura 1D e 2) com domínio de ligação à maltose (MBP) fundido no terminal amino e His-Tag na extremidade carboxi foi inserida nos sítios EcoRI/SalI do vetor pMAL-c5x. As versões truncadas codificam as regiões mais conservadas e menos conservadas da ORF *TcPhyll* (FREIRE et al., 2017).

Os plasmídeos recombinantes e o vetor pET-28a sem inserto foram introduzidos em células competentes de *Escherichia coli* (Tabela 1), via transformação por choque térmico (SAMBROOK et al., 1989).

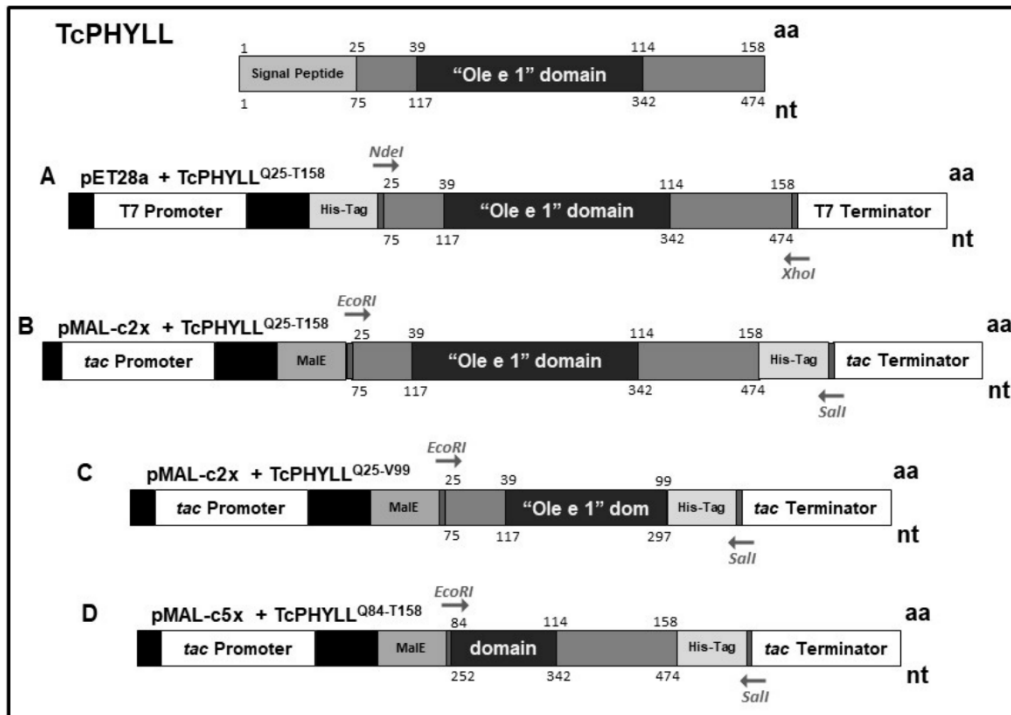


Figura 1: Construções com ORFs sintética de *Tcphyll*^{Q25-T158} nos vetores pET-28a, pMAL-c2x e pMAL-c5x. A, o inserto *Tcphyll*^{Q25-T158} inserido no sítio NdeI/XhoI do vetor de expressão pET-28a sob controle do Promotor T7. **B,** o inserto *Tcphyll*^{Q25-T158} inserido no sítio EcoRI/SalI do vetor de expressão pMAL-c2x. **C,** o inserto *Tcphyll*^{Q25-V99} inserido no sítio EcoRI/SalI do vetor de expressão pMAL-c2x. **D,** o inserto *Tcphyll*^{Q84-T158} inserido no sítio EcoRI/SalI do vetor de expressão pMAL-c5x. Em B, C e D, as construções estão sob o controle do Promotor *tac*.

MALKTLMYVCLLVAAMALAAPMAEAQLGGLISGLLGLIR	40
QDTVFCTMDGNMGVNGTATPVFPNALVQLQCGAGNVVSSA	80
TTNGSGVFSILLDPLQFLLPSLLNNCNLAVKTPLSNCNAALPSVGGLISSLQSLGSTLVGLLNIINIVPAGFRLLPST	120
	158

Figura 2: Sequência de aminoácido da TcPHYLL. Aminoácidos em cinza correspondem o peptídeo sinal. Região sublinhada corresponde a sequência do domínio tipo Ole e 1. A região hachurada de cinza corresponde a sequência de aminoácido da TcPHYLL^{Q25-V99}. Região em negrito representa a sequência de aminoácido da TcPHYLL^{Q84-T158}

Tabela 1: Células competentes utilizadas para transformação das diferentes construções utilizadas.

Plasmídeos recombinantes	Tipo de célula competente transformada
pET-28a/ <i>TcphyII</i> ^{Q25-T158}	Rosetta(DE3), BL21(DE3)pLysS, C41(DE3) e C43(DE3)
pMAL-c2x/ <i>TcphyII</i> ^{Q25-T158}	C41(DE3) e C43(DE3)
pMAL-c2x/ <i>TcphyII</i> ^{Q25-V99}	C41(DE3) e C43(DE3)
pMAL-c5x/ <i>TcphyII</i> ^{Q84-T158}	Rosetta(DE3), BL21(DE3)pLysS e C41(DE3)

2.1.2 Teste de expressão

As estirpes bacterianas de *E. coli* transformadas com pET28a/*TcphyII*^{Q25-T158}, pMAL-c2x/*TcphyII*^{Q25-T158}, pMAL-c2x/*TcphyII*^{Q25-V99}, pMAL-c5x/*TcphyII*^{Q84-T158} (Tabela 2) foram cultivadas em 2 mL de meio LB, contendo os antibióticos específicos para cada transformação (Tabela 2) e incubadas a 37 °C sob agitação de 180 rpm por 16 horas. Após o crescimento, as culturas de bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 14000 rpm por 2 minutos. Os precipitados foram utilizados como inóculos para o crescimento em 20 mL de meio LB, contendo os antibióticos citados na tabela 2. Estes inóculos foram colocados na mesma condição de agitação e temperatura até atingir ABS_{600 nm} entre 0,5 a 0,7. A expressão foi induzida mediante a adição de IPTG (Isopropil Beta-D-Tiogalactosídeo). A concentração de IPTG (mmol L⁻¹) o tempo de indução (hora), a temperatura de incubação (°C) e a agitação (RPM) utilizados nos diferentes testes de expressão (pET28a/*TcphyII*^{Q25-T158}, pMAL-c2x/*TcphyII*^{Q25-T158}, pMAL-c2x/*TcphyII*^{Q25-V99}, pMAL-c5x/*TcphyII*^{Q84-T158}) estão descritos na tabela 2. Após a etapa de indução, as culturas de células foram centrifugadas a 14000 rpm por 2 minutos e os precipitados foram ressuspensos em 400 µL de tampão de lise contendo lisozima 50 µg ml⁻¹ (Biding Buffer 1x +

lisozima 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), deixando a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram colocadas no gelo e sonicadas com uma sonda de 2 mm em 5 pulsos de 8 segundos com amplitude de 70% em ultrassonicador (GEX 30) promovendo o rompimento total das membranas até que perdesse a viscosidade. Após a lise das células, foram coletados 30 μL desses extratos brutos e adicionado 30 μL de Tampão de carregamento de SDS-PAGE 5X e 90 μL de água. Para verificar se houve a expressão, 20 μL das amostras, contendo 5 μL de extrato bruto, foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 12,5% e corado com 0,01 % de Comassie blue G-250.

O controle foi o vetor pET-28a sem inserto para o teste de expressão de pET28a/*TcphyII*^{Q25-T158} e o extrato bacteriano não induzido para o teste de expressão de pMAL-c2x/*TcphyII*^{Q25-T158}, pMAL-c2x/*TcphyII*^{Q25-V99}, pMAL-c5x/*TcphyII*^{Q84-T158}

Tabela 2: Teste de expressão de TcphyII inserido nos vetores pET-28a, pMAL-c2x e pMAL-c5x.

Plasmídeos recombinantes	Estirpe de <i>E. coli</i>	Antibiótico de resistência	[IPTG] (mMol.L^{-1})	Tempo de indução (horas)
pET-28a/ <i>TcphyII</i> ^{Q25-T158}	<i>Rosetta (DE3)</i>	Kanamicina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e Cloranfenicol 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,4	4
pET-28a/ <i>TcphyII</i> ^{Q25-T158}	<i>BL21(DE3)pLysS</i>	Kanamicina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e Cloranfenicol 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,4 e 0,1	4
pET-28a/ <i>TcphyII</i> ^{Q25-T158}	C41(DE3) e C43(DE3)	Kanamicina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,4	4
pMAL-c2x/ <i>TcphyII</i> ^{Q25-T158}	C41(DE3) e C43(DE3)	Ampicilina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,1	1,2,3,4,19,21
pMAL-c2x/ <i>TcphyII</i> ^{Q25-T158}	C41(DE3) e C43(DE3)	Ampicilina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,4	4
* pMAL-c2x/ <i>TcphyII</i> ^{Q25-T158}	C41(DE3) e C43(DE3)	Ampicilina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,4	16
pMAL-c2x/ <i>TcphyII</i> ^{Q25-V99}	C41(DE3) e C43(DE3)	Ampicilina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,4	4
pMAL-c5x/ <i>TcphyII</i> ^{Q84-T158}	<i>Rosetta (DE3)</i> , <i>BL21(DE3)pLysS</i>	Cloranfenicol 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e Ampicilina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,4	2 e 4
pMAL-c5x/ <i>TcphyII</i> ^{Q84-T158}	C41(DE3)	Ampicilina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,4	2 e 4

Os testes de expressão foram realizados na temperatura de 37°C sob agitação de 180 RPM;

*Teste realizado na temperatura de 23°C.

2.1.3 Indução e purificação de TcPHYLL^{Q84-T158} e inserida no pMAL-c5x

Após o teste de expressão, a estirpe bacteriana de *E. coli* C41(DE3) transformadas com o plasmídeo pMAL-c5x/*TcphyII*^{Q84-T158} foi selecionada para realização da indução e purificação da TcPHYLL^{Q84-T158} recombinante. A indução da proteína recombinante em um volume maior de meio de cultura (400 mL) foi obtida por adição de 0,4 mmol L⁻¹ de IPTG durante 4 horas a 37 °C. Para a purificação, o precipitado da cultura de células induzida foi lisado como descrito no item 2.1.2. O material bacteriano lisado foi centrifugado à rotação de 14.000 rpm, 4 °C por 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para purificação da proteína por cromatografia de afinidade no cromatógrafo Akta Purify (GeHealthcare) utilizando a coluna contendo Níquel (Ni) HisTrap FF crude (GeHealthCare). A purificação foi realizada utilizando a solução de tampão de ligação 1X (500 mmol L⁻¹ de NaCl 20 mmol L⁻¹ de Tris pH 7,4 e 5 mmol L⁻¹ de Imidazol) e tampão de eluição 1X (500 mmol L⁻¹ de NaCl, 20 mmol L⁻¹ de Tris pH 7,4 e 500 mmol L⁻¹ de Imidazol). A proteína recombinante com cauda de histidina foi eluída com o aumento da concentração de imidazol. As análises para verificação da expressão e purificação da TcPHYLL^{Q84-T158} foram realizadas em SDS PAGE corado com 0,01 % de Comassie blue G-250. As frações coletadas foram submetidas à diálise contra tampão PBS-1X (Tampão fosfato salino - NaCl 137 mmol L⁻¹, Fosfato 10 mmol L⁻¹, KCl 2.7 mmol L⁻¹, e um pH de 7.4). A proteína purificada foi quantificada pelo método de Bradford (1976), usando albumina do soro bovino (BSA) como padrão.

2.2 Produção de anticorpos

2.2.1 Imunização dos animais

As imunizações nos camundongos foram realizadas no Laboratório de Criação Manutenção e Experimentação Animal - Biotério (LaBIO), localizado na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), de acordo com o PROTOCOLO 06/2018, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UESC) e de acordo com os procedimentos descritos por Duarte (2007).

Para obtenção do soro policlonal específico para proteína recombinante TcPHYLL^{Q84-T158}, foram utilizados 2 camundongos machos da linhagem

C57/black, com idade de 8 semanas e com peso entre 15-16g. As imunizações foram feitas pela via intraperitoneal. A primeira imunização foi administrada com 200 μL de suspensão contendo um antígeno, o qual foi proveniente de banda correspondente a proteína recombinante retirada do SDS-PAGE corado com azul de Coomassie. Antes de imunizar os camundongos, o gel contendo a amostra proteica recombinante foi descorado, utilizando 200 μL de 25 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 em 50% de acetronitrila, posteriormente foi secado a vácuo, macerado manualmente e sonicada com uma sonda de 1 mm em 5 pulsos de 4 segundos e intervalos de 25 segundos com amplitude de 70%, em ultrassonicador (GEX 30) por 10 minutos, em seguida foi ressuspensa em 200 μL de PBS-T 1X e macerado novamente. Após 21 dias foi feita a segunda imunização, utilizando 100 μL do antígeno na concentração de 0,019 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ e 100 μL de adjuvante “Freund’s” incompleto (GIBCO/BRL). Depois de mais 21 dias os animais receberam a terceira imunização, na qual foi administrado somente 100 μL do antígeno na concentração de 0,019 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. A eutanásia, utilizando o método de guilhotina, foi realizada em apenas um camundongo, 10 dias após a terceira imunização, sendo possível a coleta do sangue total do animal. No outro animal, o *booster* foi aplicado 21 dias depois da terceira imunização, procedendo após 48 horas à sangria total, utilizando o mesmo método de guilhotina.

Como controle negativo, utilizamos dois camundongos da mesma raça, idade e peso, nos quais não foram aplicado o antígeno.

2.2.2 Obtenção do soro imune à proteína TcPHYLL^{Q84-T158}

O soro pré-imune (controle) foi coletado antes da primeira imunização, e as frações de antissoro imune TcPHYLL^{Q84-T158} foram coletadas a cada 21 dias após cada imunização. As coletas do sangue para o isolamento do soro foram feitas por pequenas punções na veia da cauda dos camundongos. As amostras de sangue coletadas foram colocadas em banho Maria à 37 °C por 30 minutos, em seguida foram colocadas no gelo por mais 30 min, depois centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente e os soros separados foram estocados a -20 °C até o momento do uso. As amostras de sangue dos animais controle para separação do soro também foram coletadas no mesmo intervalo de tempo.

2.2.3 Titulação do anticorpo (Dot-Blot)

Para titulação dos antissoros policlonais produzidos para detecção da proteína recombinante TcPHYLL^{Q84-T158} foi utilizado a técnica de Dot-blot. A membrana de nitrocelulose (MN) (BIO-RAD, com poro de 0,45 µm) utilizada para titulação do anticorpo foi marcada conforme descrita na figura 3. Em seguida, o sistema Bio-Dot SF (BIO-RAD) foi montado. A membrana de nitrocelulose marcada foi saturada com o antígeno diluído nas proporções de 2,5; 1,25; 0,625 e 0,3125 µg/poço em tampão PBS (tampão fosfato salino, pH7.4) (Figura 3). Para cada concentração foi feita cinco réplicas, as quais foram utilizadas para titulação do anticorpo dos diferentes antissoros dos dois camundongos (Figura 3 e Tabela 3). Posteriormente, a membrana foi seca por 15 minutos a temperatura ambiente. Feito isso, o sistema foi desmontado para a retirada da membrana. As colunas enumeradas de 1 a 5 da MN foram cortadas em 5 tiras e utilizadas para a titulação dos diferentes anticorpos. As tiras da membrana saturada com diferentes concentrações do antígeno foram bloqueadas por 30 min sob agitação com uma solução de bloqueio (TBS-Tween 20 com adição de 5% de leite em pó desnatado), para minimizar a ocorrência de reações inespecíficas. Em seguida, as tiras da MN foram lavadas com tampão TBS-T 1X e incubadas com os diferentes antissoros a serem titulados. Cada fita de MN foi colocada em tubos contendo o antissoro correspondente diluídos 1:500 em TBS-T 1X por 2 horas sob agitação em temperatura ambiente. Posteriormente, as tiras foram retiradas dos tubos e lavadas três vezes com tampão TBS-T (3X de 5 minutos), em seguida, foram submetidas ao mesmo anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina, diluído na proporção de 1:2666, por 1h em temperatura ambiente sob agitação. Após a incubação, as mesmas foram lavadas três vezes com TBS-T (1x de 15 minutos e 2x de 5 minutos).

A revelação das tiras de MN foi feita utilizando os substratos BCIP/NBT. Primeiramente, as tiras de MN foram incubadas por 10 minutos com 40 mL de tampão de revelação (5 mM de MgCl, 100 mM de NaCl, 100 mM de Tris-HCL, pH 9,8 e H₂O), posteriormente o tampão foi retirado. Em seguida, as tiras de MN foram reveladas numa solução contendo 15 µL de NBT e 7,5 µL BCIP (PROMEGA), em 5mL de tampão revelação. A revelação teve duração de 10 minutos, posteriormente, água destilada foi adicionada para evitar que as tiras

de MN fossem queimadas pela ação dos resíduos gerados e, conseqüentemente, a revelação foi bloqueada.

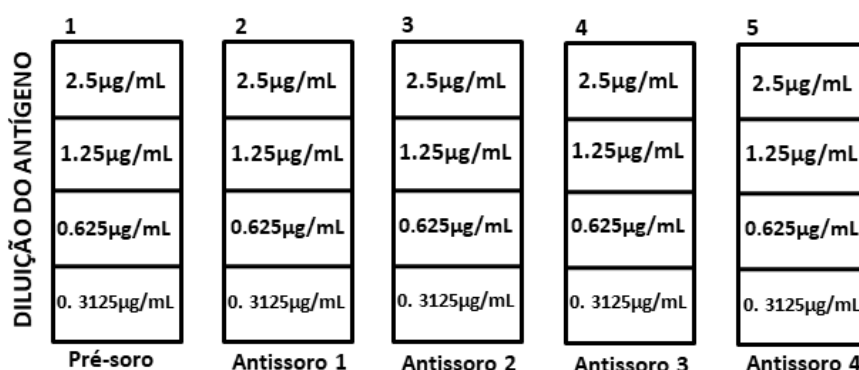


Figura 3: Marcação da membrana de nitrocelulose (MN) para titulação do anticorpo por Dot-Blot. Colunas numeradas de 1 a 5 correspondentes as tiras de membrana que foi incubada com os diferentes anti-soro.

Tabela 3: Identificação dos antissoros utilizados para titulação do anticorpo dos dois camundongos.

	Pré-soro	Antissoro 1	Antissoro 2	Antissoro 3	Antissoro 4
Camundongo 1	Amostra sem imunização	21 dias após a 1ª imunização	10 dias após a 2ª imunização	21 dias após a 2ª imunização	10 dias após a 3ª imunização (sangria total)
Camundongo 2	Amostra sem imunização	21 dias após a 1ª imunização	10 dias após a 2ª imunização	21 dias após a 2ª imunização	48 horas após a o booster (sangria total)

2.3 Análise de Bioinformática

2.3.1 Análise de alinhamento da filoplanina de cacau com a sequência de proteína alergênica de pólen Ole e 1 e filoplanina de *Arabidopsis*.

A sequência de uma proteína não caracterizada de *Arabidopsis*, denominada AtQ9LUR8 (número de acesso BAB02757.1) (SHEPHERD 2005) foi utilizada para realizar uma busca de proteínas homólogas utilizando a ferramenta BLASTp (ALTSCHUL et al., 1997) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), cuja análise retornou com duas sequências do gênero *Arabidopsis*, a proteína alergênica de grão-de-pólen, Ole e 1, de *Arabidopsis thaliana* (NP_001326202.1) e a filoplanina de *A. lyrata* (XP_002883017.1).

As sequências selecionadas foram submetidas a múltiplos alinhamentos por meio da plataforma Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para análise de regiões de domínios e sítios conservados. O peptídeo sinal das proteínas foi removido para análise de alinhamento.

As sequências das três proteínas também foram analisadas na plataforma do InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

2.3.2 Construção do modelo tridimensional de TcPHYLL

A modelagem da estrutura tridimensional da filoplanina do cacau, TcPHYLL, foi construída utilizando a ferramenta disponível online I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (YANG & ZHANG, 2015). Essa ferramenta realiza a predição de estruturas tridimensionais e anotação funcional pelo método de LOMETS (Local Meta-Threading Server), o qual recupera proteínas modelo de dobras semelhantes com sequência de consulta no banco de dados PDB (Protein Data Bank). E, em caso de regiões não-similares, as modelagens são realizadas pelo método *ab initio* (ROY et al., 2010).

Após a construção do modelo, a estrutura foi submetida a refinamento utilizando o software ModRefiner (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ModRefiner/>) (XU & ZHANG, 2011). Por fim, a qualidade estereoquímica e a validação do modelo gerado foi realizado por meio do software PROCHECK (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>) (LASKOWSKI et al., 1993). Para comparação da estrutura 3D da filoplanina do cacau e seu molde (PDB 4z8wA), a ferramenta TM-align (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-align/>) (ZHANG & SKOLNICK, 2005) foi utilizada visando sobrepor as duas estruturas e obter o RMSD (root-mean-square deviation) final. A visualização da estrutura 3D da proteína TcPHYLL e o desenvolvimento das imagens foram realizadas pelo software Discovery Studio 4.0.

3. Resultados

3.1 Expressão da filoplanina recombinante em sistema heterólogo

Primeiramente, os testes de expressão da filoplanina recombinante foram realizados com plasmídeo pET28a/*TcphyII*^{Q25-T158} (Figura 1A) transformado nas estirpes de *E. coli* - C41(DE3) (Figura 4A), C43(DE3) (Figura 4B), *Rosetta*(DE3) (Figura 4C), *BL21*(DE3)pLysS (Figura 4D). O perfil proteico das diferentes colônias contendo pET28a/*TcphyII*^{Q25-T158} induzidas com IPTG (Figura 4) não apresenta banda diferencial com massa molecular de 13,8 kDa (Tabela 4) esperada para a TcPHYLL.

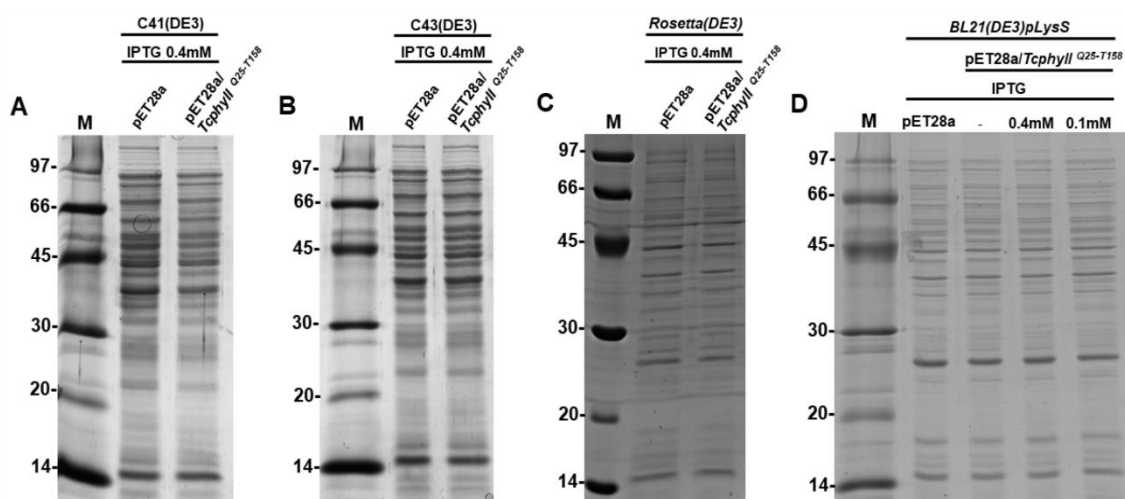


Figura 4: Teste de expressão da rTcPHYLL em diferentes estirpes de *E. coli*. M, corresponde ao padrão de massa molecular. pET28a, extrato da bactéria transformada com o vetor sem inserto (controle). **A**, plasmídeo pET28a/*TcphyII*^{Q25-T158} transformado em células competentes C41(DE3). **B**, plasmídeo pET28a/*TcphyII*^{Q25-T158} transformado em células competentes C43(DE3). **C**, plasmídeo pET28a/*TcphyII*^{Q25-T158} transformado em células competentes *Rosetta*(DE3). **D**, plasmídeo pET28a/*TcphyII*^{Q25-T158} transformado em células competentes *BL21*(DE3)pLysS. pET28a/*TcphyII*^{Q25-T158}, extrato de bactéria induzido com IPTG 0.4 mmol L⁻¹ por 4 horas a 37°C.

Diante destes resultados, o teste de expressão com plasmídeo o pMAL-c2x/*TcphyII*^{Q25-T158} (Figura 1B) transformado nas estirpes de *E. coli* C41(DE3) e C43(DE3) foi realizado em diferentes condições de temperatura e concentração de IPTG (Figura 5 e 6). Nos testes feitos, a expressão da filoplanina recombinante não foi observada, pois não apareceu nenhuma banda diferencial com massa molecular de 54,3 kDa (13,8 kDa da proteína em estudo e 40,5kDa do domínio de ligação à maltose) (Tabela 4) nas colônias contendo pMAL-

c2x/Tcphyll^{Q25-T158} induzidas com IPTG (Figura 5 e 6). Isso evidencia que não houve acúmulo da proteína no extrato bacteriano das estirpes testadas.

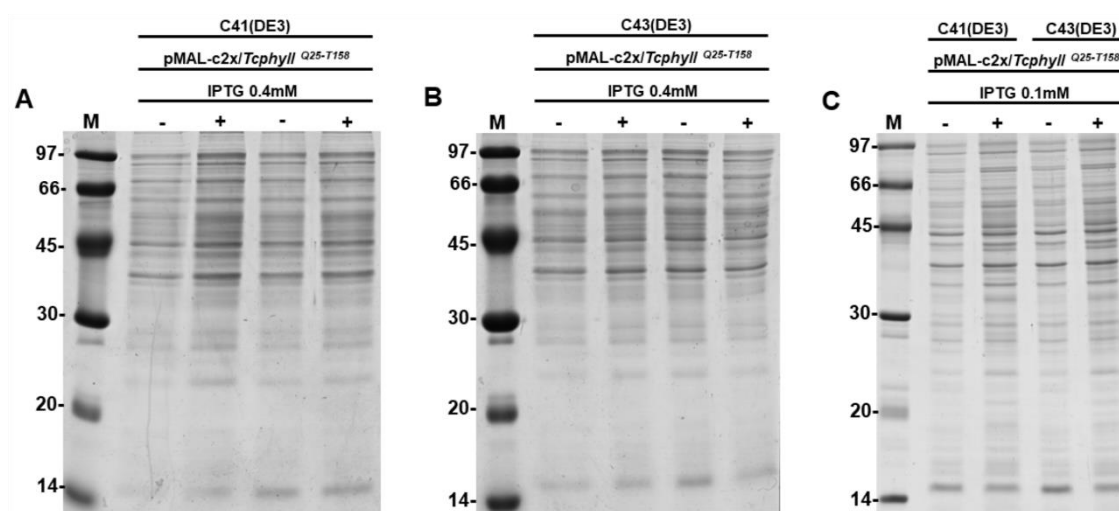


Figura 5: Teste de expressão do plasmídeo *pMAL-c2x/Tcphyll*^{Q25-T158} transformado em células competentes C41(DE3) e C43(DE3). M, corresponde ao padrão de massa molecular. **A**, plasmídeo *pMAL-c2x/Tcphyll*^{Q25-T158} transformado em célula competente C41(DE3). **B**, plasmídeo *pMAL-c2x/Tcphyll*^{Q25-T158} transformado em célula competente C43(DE3). **A** e **B**, *pMAL-c2x/Tcphyll*^{Q25-T158}, extrato de bactéria induzido por 4 horas a 37 °C. **C**, *pMAL-c2x/Tcphyll*^{Q25-T158}, extrato de bactéria induzido por 16 horas a 23 °C. A concentração de IPTG está indicada na figura.

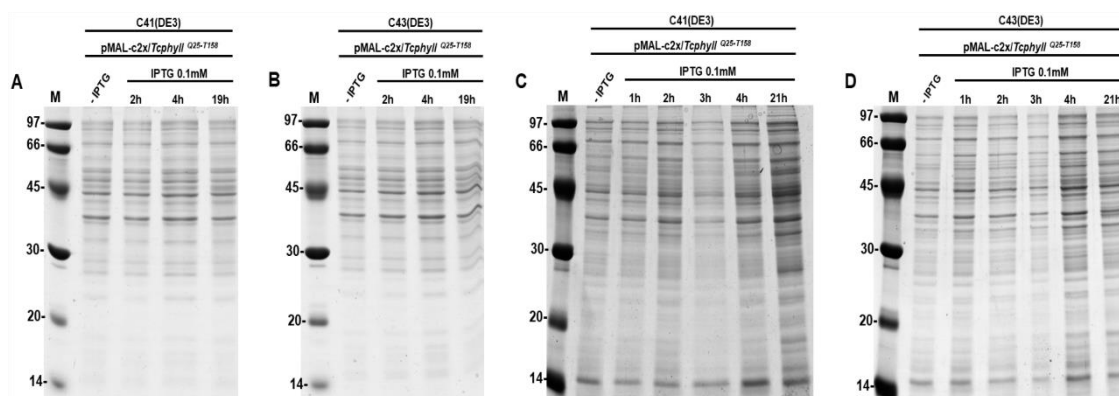


Figura 6: Teste de expressão do plasmídeo *pMAL-c2x/Tcphyll*^{Q25-T158} transformado em células competentes C41(DE3) e C43(DE3). M, corresponde ao padrão de massa molecular. **A** e **C**, plasmídeo *pMAL-c2x/Tcphyll*^{Q25-T158} transformado em célula competente C41(DE3). **B** e **D**, plasmídeo *pMAL-c2x/Tcphyll*^{Q25-T158} transformado em célula competente C43(DE3). Os tempos de indução e a concentração de IPTG estão indicados na figura.

Tabela 4: Massa total predita (kDa) e coordenadas de aminoácidos da TcPHYL nas construções

	Massa Total (kDa)	Coordenadas de aminoácidos
TcPHYLL ^{Q25-T158}	13,8	Gln25 a Thr158
TcPHYLL ^{Q25-V99}	7,7	Gln25 a Val99
TcPHYLL ^{Q84-T158}	7,3	Gln84 a Thr158
Domínio maltose (MBP)	40,5	
TcPHYLL ^{Q25-T158} - MBP	54,3	
TcPHYLL ^{Q25-V99} - MBP	48,2	
TcPHYLL ^{Q84-T158} - MBP	47,8	

O teste de expressão de rTcPHYLL^{Q25-V99} transformada em *E. coli* C41(DE3) e C43(DE3) (Figura 7) também não mostrou presença de banda diferencial com massa molecular de 48,2 kDa. (7,7 kDa da proteína em estudo e 40,5 kDa do domínio de ligação à maltose) (Tabela 4) no perfil proteico das colônias contendo pMAL-c2x/*Tcphyl*^{Q25-V99} induzidas. Isso evidencia que não houve acúmulo da proteína no extrato bacteriano das estirpes testadas. Por outro lado, o teste de expressão de rTcPHYLL^{Q84-T158} transformada em diferentes estirpes de *E. coli* Rosetta(DE3) (Figura 8A), BL21(DE³)pLysS (Figura 8A) e C41(DE3) (Figura 8B) mostrou uma banda com massa molecular de 47,8 kDa (7,3 kDa da proteína em estudo e 40,5 kDa do domínio de ligação à maltose) (Tabela 4) nas colônias contendo pMAL-c5x/*Tcphyl*^{Q84-T158} induzidas. Isso confirma o acúmulo da proteína no extrato bacteriano das estirpes testadas (Figura 8A e B). A proteína recombinante, rTcPHYLL^{Q84-T158}, transformada em C41(DE3) foi induzida em larga escala e o teste de solubilidade foi realizado. rTcPHYLL^{Q84-T158} foi expressa nas frações solúvel e insolúvel do extrato bacteriano (Figura 8C) induzido e, em seguida, foi purificada com alta pureza (Figura 8C).

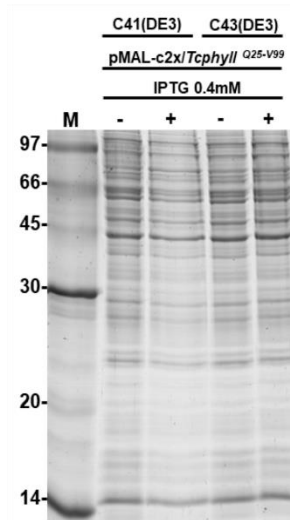


Figura 7: Teste de expressão do plasmídeo *pMAL-c2x/Tcphyll*^{Q25-V99} transformado em células competentes *C41(DE3)* e *C43(DE3)*. **M**, corresponde ao padrão de massa molecular. *pMAL-c2x/Tcphyll*^{Q25-V99}, extrato de bactéria induzido por 4 horas. A concentração de IPTG está indicada na figura.

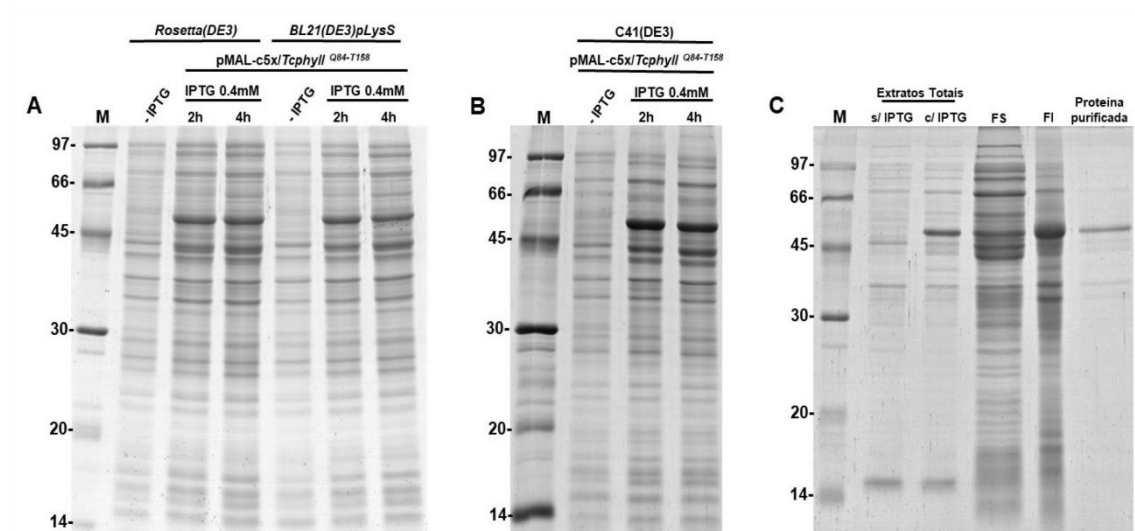


Figura 8: Teste de expressão do plasmídeo *pMAL-c2x/Tcphyll*^{Q84-T158} transformado em células competentes *Rosetta(DE3)*, *BL21(DE3)pLysS* e *C41(DE3)*. **M**, corresponde ao padrão de massa molecular. **A**, plasmídeo *pMAL-c2x/Tcphyll*^{Q84-T158} transformado em células competentes *Rosetta(DE3)* e *BL21(DE3)pLysS*. **B**, Plasmídeo *pMAL-c5x/Tcphyll*^{Q84-T158} transformado em células competentes *C41(DE3)*. Os tempos de indução e a concentração de IPTG estão indicados na figura. A temperatura é 37°C. **C**, **Expressão e purificação de rTcPHYLL**^{Q84-T158}. Plasmídeo *pMAL-c5x/Tcphyll*^{Q84-T158} transformado em células competentes *C41(DE3)*. **M**, corresponde ao padrão de massa molecular. Extratos totais bacteriano sem indução por IPTG (controle) e induzido com IPTG 0.4 mmol L⁻¹ por 4 horas. **FS**, fração solúvel do extrato bacteriano induzida com IPTG 0.4 mmol L⁻¹ por 4 horas. **FI**, fração insolúvel do extrato bacteriano induzida com IPTG 0.4 mmol L⁻¹ por 4 horas. **Proteína putificada**, rTcPHYLL^{Q84-T158} purificada a partir da fração solúvel.

3.2 Ensaios de titulação do anticorpo (Dot-Blot)

Os resultados do ensaio de *Dot-blot*, utilizando a diluição dos antíseros de 1:500, mostraram que os anticorpos produzidos foram capazes de reconhecer a proteína recombinante TcPHYLL^{Q84-T158} em diferentes concentrações. No camundongo 1, todos os antíseros das diferentes imunizações foram capazes de detectar o antígeno nas concentrações de 2,5 µg mL⁻¹ e 1,25 µg mL⁻¹, sendo que os antíseros 2, 3 e 4 apresentaram melhor detecção da proteína (Figura 9). Ainda, os antíseros 2, 3 e 4 reconheceram a proteína recombinante TcPHYLL^{Q84-T158} também na concentração menor de 0,625 µg mL⁻¹ (Figura 9). No camundongo 2, o antissor 1 não revelou boa capacidade de detectar o antígeno. No entanto, os antíseros 2, 3 e 4 reconheceram a proteína recombinante TcPHYLL^{Q84-T158} em todas as concentrações (2,5 µg mL⁻¹, 1,2 µg mL⁻¹, 0,6 µg mL⁻¹ e 0,3 µg mL⁻¹). Como era esperado, para o soro pré-imune não foi observado nenhuma reação.

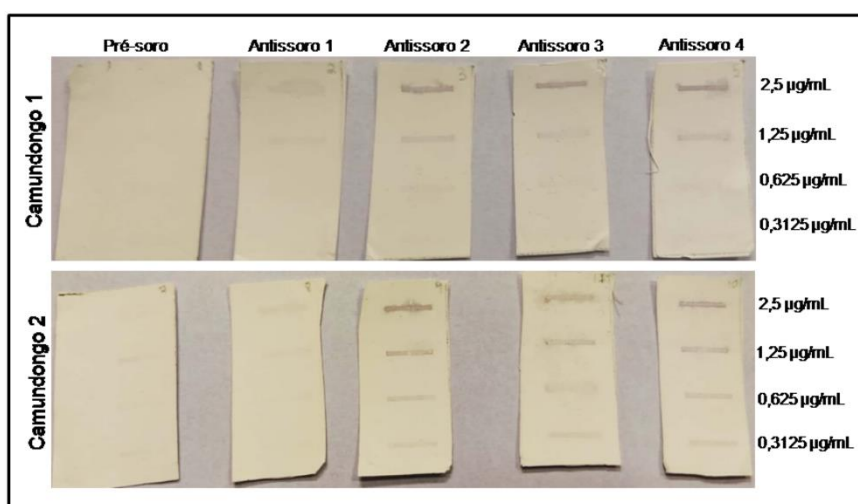


Figura 9: Titulação dos antíseros produzidos no camundongo 1 e 2 (*Dot-blot*). Os antíseros policlonais produzidos foram capazes de detectar a proteína rTcPHYLL^{Q84-T158} aplicada em diferentes concentrações. Nenhuma reação foi observada para o soro pré-imune com a proteína imobilizada na membrana de nitrocelulose.

3.3 Análise de bioinformática da sequência da filoplanina de cacau e modelo tridimensional de TcPHYLL

A análise de BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com base na proteína desconhecida AtQ9LUR8 (acesso: BAB02757.1) de *Arabidopsis* mostrou uma identidade de 100% com uma proteína alergênica do pólen Ole e

1 de *A. thaliana* (NP_001326202.1), significando ser a mesma proteína. Esse mesmo alinhamento identificou uma outra proteína, a filoplanina de *A. lyrata* (XP_002883017.1) com 84% de identidade. Com base neste resultado, um alinhamento entre as duas sequências do gênero *Arabidopsis* e a sequência da filoplanina de *Theobroma cacao* (XM_007035564.2) foi realizado (Figura 10).

A análise do alinhamento demonstrou que o domínio tipo Ole e 1, caracterizado como uma região própria de proteínas alergênicas do pólen, é conservado entre as três proteínas, apresentando um percentual de identidade acima de 50% (Figura 10). A identidade entre a sequência do domínio tipo Ole e 1 da proteína alergênica de grão-de-pólen Ole e 1 de *A. thalianae* e da filoplanina de *T. cacao* é de 57,1%; e entre a sequência do domínio tipo Ole e 1 da filoplanina de *A. lyrata* e da filoplanina de *T. cacao* é de 58,3%. A similaridade entre a sequência do domínio tipo Ole e 1 das três proteínas alinhadas foi de 73%.

Segundo a análise da plataforma InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), as três proteínas alinhadas pertencem a família Phylloplanin-like e apresentam uma sequência referente ao domínio tipo Ole e 1.

<i>Theobroma cacao</i>	-----QLGGLISGLLGLIRIQDTVFCTMDGNMGVNGT	32
<i>Arabidopsis lyrata</i>	QLGLGGGGGGGGLIGGLGGLVGGGLVGGALVGGILNLVNINGVVFCSLNGA--LNGT	58
<i>Arabidopsis thaliana</i>	QLGLGGS-----GGLGGLIGGLVGGGLVGGILNLVNINGVVFCSLNGA--PSGT	53
<i>Theobroma cacao</i>	ATPVFPNALVQLQCGAGN-VVSSATTNGSGVFSILLDPLQFLLPSILLNCCNLAVKTPLSN	91
<i>Arabidopsis lyrata</i>	STPAFANAGVQLQCGRQNRVVSATTNAAGLFTLPTDTIQMLLSTLLSDCRVVVTTPLST	118
<i>Arabidopsis thaliana</i>	STPAFANAGVELQCGRQNRVVSATTNAAGLFSLPTDSIQMLLSTLLSDCRVVVTTPLST	113
<i>Theobroma cacao</i>	CNAALPSVGGLISSLSLQSLGSTLVGLLNIINIVPAGFRLLPST	133
<i>Arabidopsis lyrata</i>	CNANLPSVGNLVSRLAMIGNSLTGLLNIISIIIPAGFGLLT--	158
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CNANLPSVGNLVSRLAMIGNSLTGLLNIISIIIPAGFGLLN--	153

Figura 10: Alinhamento da filoplanina de *Theobroma cacao* e filoplanina de *Arabidopsis lyrata* e proteína alergênica de pólen Ole e 1 de *A. thaliana*: Sublinhado, região do domínio tipo Ole e 1. Em amarelo, região conservada das três proteínas: filoplanina de *T. cacao* e filoplanina de *A. lyrata* e proteína alergênica de pólen Ole e 1 de *A. thaliana*. Em azul, os resíduos de aminoácidos similares das três proteínas. Em rosa, a região conservada em filoplanina de *A. lyrata* e proteína alergênica de pólen Ole e 1 de *A. thaliana*. Em verde, região conservada em filoplanina de *T. cacao* e filoplanina de *A. lyrata*. Em vermelho, região conservada em filoplanina de *T. cacao* e proteína alergênica de pólen Ole e 1 de *A. thaliana*.

Para a proteína TcPHYLL não foi encontrada proteínas homólogas com identidade superior ou igual a 25% no banco de dados PDB, por isso, TcPHYLL foi modelada de acordo com o software online I-TASSER (YANG & ZHANG, 2015). O modelo tridimensional para TcPHYLL foi gerado a partir do molde 4z8wA. O modelo gerado possui 0,158 de identidade e 0,857 de cobertura com o molde; e valor de C-score de -0,75. O valor de TM-score (Template Modeling Score) utilizado para avaliar a similaridade entre as estruturas das proteínas foi de 0.786 (Figura 11).

Após o refinamento com o ModRefiner, a qualidade estereoquímica do modelo foi avaliada pelo PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993). O gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN et al., 1963) mostra que a estrutura possui 99% dos resíduos de aminoácidos em regiões energeticamente favoráveis (Figura 12). O RMSD inicial obtido do software I-TASSER era de 1,62 Å e, após refinamento, ficou 1,564 Å conforme mostrado no alinhamento das estruturas tridimensionais realizado pelo software TM-align, em que é possível visualizar padrões de dobras semelhantes entre as proteínas (Figura 13).

O modelo tridimensional de TcPHYLL mostrou que a proteína possui um barril- β com 7 folhas- β e pronunciadas regiões de loop destacadas por coloração em prata na imagem (Figura 11A). Ainda, quatro cisteínas podem ser visualizadas no modelo tridimensional de TcPHYLL, sendo que três destas cisteínas estão em regiões de folhas- β e uma está presente na região de alça do domínio tipo Ole e 1 (Figura 11B).

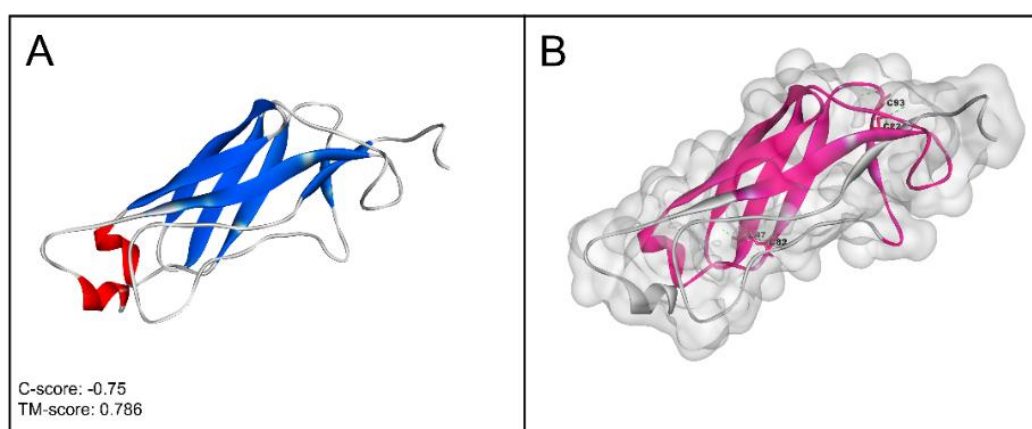


Figura 11: Estrutura tridimensional de TcPHYLL a partir do molde Pla I 1 de *Plantago lanceolata* (4z8wA). A, TcPHYLL mostrando um barril- β com 7 folhas- β (azul), 2 α -hélice (vermelha) e pronunciadas regiões de loop (cinza). B, TcPHYLL mostrando quatro cisteínas, três em regiões de folhas- β e uma na região de alça.

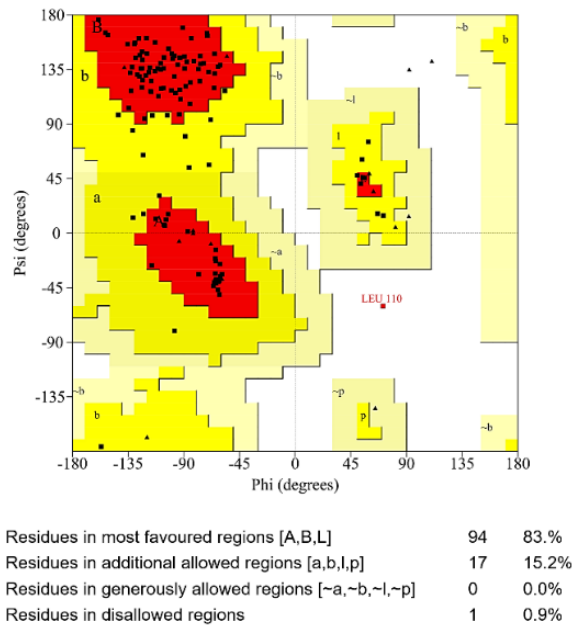


Figura 12: Gráfico de Ramachandran, validando o modelo tridimensional. Estrutura com 99% dos resíduos de aminoácidos em regiões energeticamente favoráveis



Figura 13: Alinhamento entre as estruturas tridimensionais TcPHYLL e Pla I 1, mostrando padrões de dobras semelhantes entre as proteínas.

4. Discussão

A filoplanina é uma glicoproteína secretada por tricomas glandulares e está envolvida no sistema de defesa inato (SHERPHERD e al., 2005) e induzido da planta (FREIRE e al., 2017). A primeira caracterização do gene da filoplanina do cacau (*Tcphyll*) mostra que sua ORF possui 477 pb, codificando uma proteína

predita de 158 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 16 kDa. Esta proteína predita apresenta peptídeo sinal e possíveis sítios de glicosilação e fosforilação (FREIRE et al., 2017). A filoplanina do cacau, apesar de apresentar um domínio tipo Ole e 1 de proteína alergênica, é filogeneticamente similar à filoplanina de outras plantas, possuindo quatro resíduos conservados de cisteína nas posições 46, 71, 106, 117 (FREIRE et al., 2017), enquanto as proteínas alergênicas possuem seis resíduos de cisteína conservados nas posições 19, 22, 43, 78, 90 e 131, os quais são ligados por pontes de dissulfetos fundamentais para a estabilização da sua conformação (VILLALBA et al. 1993 e 1994; GONZALEZ et al. 2000). A ligação dissulfeto da sequência da proteína Ole e 1 ocorre entre Cys19 e Cys90, Cys22 e Cys131, Cys43 e Cys 78 (GONZÁLEZ et al., 2000). TcHYLL apresenta apenas duas ligações dissulfeto - Cys46 e Cys117; e Cys 71 e Cys106 -, o que pode justificar a perda ou decréscimo do seu potencial alergênico. Embora já tenham estudos *in silico* sobre as características do gene que codifica esta proteína, ainda não está claro qual a função da filoplanina do cacau (FREIRE et al., 2017). A caracterização funcional de uma proteína pode ser realizada a partir da sua expressão por meio de sistema heterólogo em procarioto (KAUR et al., 2018).

Dessa maneira, proteínas de defesa do cacau têm sido expressas em *E. coli*, a exemplo das cistatinas – TcCYS1, TcCYS2, TcCYS3 e TcCYS4 (PIROVANI et al., 2010; CARDOSO et al., 2015; FREITAS et al., 2015), peroxidase de ascorbato - Tc-cAPX (CAMILLO et al., 2013), b-1,3-1,4-glucanase – TcGlu2 (BRITO et al., 2013), proteína relacionada à patogênese PR-4b – TcPR-4b (MENEZES et al., 2014), proteases de cisteína tipo papaína - TcCYPR04 (CARDOSO et al., 2015), proteínas relacionada à patogênese 1 – TcPR-1f e TcPR-1g (TOSARINI et al., 2018) e proteína que atua na morte celular programada no estágio final da doença da vassoura-de-bruxa – TcSBP (ALVES et al., 2019) . Estes resultados mostram como estas proteínas desempenham seu papel na resposta de defesa do cacau contra os fitopatógenos.

Dessa forma, primeiramente a ORF sintética codificando a proteína recombinante, rTcPHYLL^{Q25-T158}, foi clonada no plasmídeo pET28a, sob o controle do promotor do bacteriófago T7 (STUDIER et al., 1990; KAUR et al., 2018). Este vetor é utilizado para expressar proteína recombinante em *Escherichia coli*, no qual a transcrição é catalisada pela T7 RNA polimerase

(manual pET; STUDIER et al., 1990). Este sistema de expressão é eficiente, sendo um dos mais utilizados para produzir grandes quantidades de proteínas recombinantes (SORENSEN & MORTENSEN, 2005). No entanto, nem sempre esse resultado é obtido, já que algumas proteínas podem apresentar toxicidade durante a superexpressão (STUDIER et al., 1990; MIROUX & WALKER; 1996; DUMON-SEIGNOVERT et al., 2004; KIMELMAN et al., 2012). O efeito tóxico pode causar morte das células de *E. coli* ou deficiência no crescimento, o que interfere na sua capacidade de expressão (MIROUX & WALKER; 1996; DUMON-SEIGNOVERT et al., 2004; GIACALONE et al., 2006; GUAN et al., 2013). Essas informações podem explicar a ausência de rTcPHYLL^{Q25-T158} no extrato bacteriano de *E. coli* da estirpe *Rosetta (DE3)*. Esta estirpe, embora facilite a expressão de genes que codificam códons raros, carrega o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor *lacUV5* (Manual Novagen; KAUR et al., 2018). Diante disso, a transformação foi feita em *BL21(DE3) pLysS*. Esta possui um inibidor natural da T7 RNA polimerase (lisozima T7) (KAUR et al., 2018), o que a torna mais tolerante a plasmídeos tóxicos (STUDIER et al., 1990). Porém, a expressão da rTcPHYLL^{Q25-T158} nesta estirpe de célula competente também não foi observada. Em função disso, a transformação do plasmídeo pET28a/*Tcphyll*^{Q25-T158} nas estirpes C41(DE3) e C43(DE3) foi realizada. Estas são especializadas em expressão de proteínas tóxicas, pois possuem mutações no promotor *lacUV5* do gene *T7 RNAP* (MIROUX & WALKER; 1996; DUMON-SEIGNOVERT et al., 2004; KWON et al., 2015; KAUR et al., 2018). No entanto, a expressão da proteína de interesse também não foi detectada.

Diante desses resultados, sugerimos que a ausência de expressão da proteína pode estar relacionada a uma possível instabilidade do plasmídeo, o que pode proporcionar perda das células hospedeiras e, conseqüentemente, diminuir a produtividade da proteína (FRIEHS, 2004). Assim, a clonagem da proteína recombinante rTcPHYLL^{Q25-T158} foi realizada no plasmídeo pMAL-c2x, já que este foi utilizado no sistema de expressão heteróloga da filoplanina recombinante de *Nicotina tabacum* (SHERPHERD et al., 2005). Este vetor utiliza o promotor *tac* (KAUR et al., 2018) e possui o gene *malE* de *E. coli*. Esse gene, geralmente, confere alto nível de expressão, pois codifica uma proteína de ligação a maltose (MBP) com peso molecular, de 42,5 kDa no citoplasma (Manual pMAL; MAINA et al., 1988; KAUR et al., 2018). Vetores apresentando

expressão de proteína fusionada a outra proteína podem proporcionar benefícios ao sistema heterólogo, aumentando o acúmulo da proteína recombinante em *E. coli* (HOCKNEY, 1994; HANNING & MAKRIDES, 1998). A maioria das proteínas fusionadas estão na conformação nativa, não acumulando no corpo de inclusão (HOCKNEY, 1994; HANNING & MAKRIDES, 1998). Ainda, a construção de proteínas fusionadas nas regiões N- e C-terminais pode minimizar a ação proteolítica de proteínas recombinantes em *E. coli* (HANNING & MAKRIDES, 1998). A proteína de membrana (receptor de neurotensina) fusionada com a MBP apresenta um aumento de 40 vezes no acúmulo de sua forma ativa (HOCKNEY, 1994). Além dessa estratégia para otimizar a expressão da filoplanina do cacau em sistema heterólogo, o plasmídeo pMAL-c2x/*Tcphyll*^{Q25-T158} foi transformado em estirpes mais resistente de *E. coli*, C41(DE3) e C43(DE3). No entanto, também não foi observado acúmulo da proteína recombinante, rTcPHYLL^{Q25-T158}, no extrato bacteriano, mesmo em fusão com o domínio de maltose na região N-terminal e cauda de His na extremidade carboxiterminal, juntamente com a utilização de estirpes especializadas para proteínas tóxicas (MIROUX & WALKER, 1996; DUMON-SEIGNOVERT et al., 2004; KWON et al., 2015).

A análise de alinhamento no BLAST mostra que uma proteína não caracterizada de *Arabidopsis*, denominada AtQ9LUR8 (número de acesso no GenBank: BAB02757.1) (SHEPHERD, 2004), apresenta identidade de 100% com uma proteína alergênica de polén Ole e 1 de *A. thaliana* e 84% com a filoplanina de *A. lyrata*. Esta proteína foi testada em sistema heterólogo em *E. coli* e, após a adição do IPTG, as células bacterianas pararam o crescimento. A proteína AtQ9LUR8 inibe o crescimento de *E. coli*, apresentando uma atividade antibacteriana (SHEPHERD, 2004).

O alinhamento da sequência da filoplanina do cacau com proteínas semelhantes a filoplanina de outras espécies de plantas revela o grau de conservação entre os aminoácidos (Figura 10). A região inicial da sequência com 74 resíduos de aminoácidos é a região aminoterminal conservada, contendo 70 resíduos de aminoácidos do domínio tipo Ole e 1 (Figura 1C e 2) (FREIRE et al., 2017). Partindo desse conhecimento, o plasmídeo da primeira versão truncada foi desenhado - pMAL-c2x/*Tcphyll*^{Q25-V99}. A região carboxiterminal menos conservada, contendo 30 resíduos de aminoácidos do domínio tipo Ole e 1, foi

utilizada para construir o plasmídeo da segunda versão truncada da filoplanina - pMAL-c5x/*Tcphyll*^{Q84-T158} (Figura 1D e 2) (FREIRE et al., 2017).

O teste de expressão em *E. coli* foi realizado para as duas versões truncadas. Os resultados destes testes podem estar relacionados com a presença do domínio tipo Ole e 1, já que não houve expressão da TcPHYLL^{Q25-V99} recombinante (contém a região mais conservada e maior parte do domínio tipo Ole e 1), mas ocorreu a expressão da TcPHYLL^{Q84-T158} recombinante (contém a região menos conservada e menor parte do domínio tipo Ole e 1). Para confirmar ainda mais essa hipótese, o alinhamento feito entre a sequência completa da filoplanina do cacau e a sequência da AtQ9LUR8 de *A. thaliana* (suposta proteína alergênica de pólen Ole e 1) mostra 57,1% de identidade e 73% de similaridade entre o domínio tipo Ole e 1 das duas proteínas.

O modelo tridimensional de TcPHYLL apresentou o valor de C-score acima de -5.2, o que indica um modelo com boa qualidade, pois o C-score é uma pontuação de confiança que estima a qualidade dos modelos previstos pelo I-TASSER. A similaridade entre as estruturas do molde 4z8wA e do modelo 3D de TcPHYLL mostrou uma combinação significativa entre as duas estruturas, já que o valor do TM-score (Template Modeling Score) foi maior que 0.5 e mais próximos de 1 (ZHANG & SKOLNICK, 2004; XU & ZHANG, 2010). Ainda, o modelo tridimensional de TcPHYLL, apesar de ter apenas quatro resíduos de cisteínas no domínio tipo Ole e 1 de sua estrutura, apresenta semelhança com o molde 4z8wA, que é uma estrutura cristal da proteína alergênica do pólen (Pla I 1) da banana-da-terra inglesa (*Plantago lanceolata*) (STEMESEDER et al., 2017). Isso sugere que o domínio tipo Ole e 1 de TcPHYLL pode apresentar um nível de alergenicidade. As pronunciadas regiões de loop presente na estrutura 3D de TcPHYLL podem estar relacionadas a ligação de anticorpos altamente específicos para cada proteína alergênica (STEMESEDER et al., 2017).

Os resultados obtidos sugerem que a expressão de rTcPHYLL^{Q25-T158} completa, após a indução por IPTG, produz um efeito tóxico capaz de afetar a sobrevivência das células de *E. coli*. Diante disso, sugerimos que o sistema de expressão heteróloga em procarionto não é eficiente para produzir a filoplanina completa do cacau. Por outro lado, a versão truncada com a eliminação da maior parte do domínio tipo Ole e 1 - rTcPHYLL^{Q84-T158} – foi expressa em *E. coli*. Isto sugere que a região do domínio tipo Ole e 1 pode estar relacionada com a parte

funcional da proteína, sendo essencial para essa toxicidade, uma vez que não foi expressa em *E. coli*. Ainda, a estrutura tridimensional de TcPHYLL e o alinhamento mostram semelhanças com proteínas alergênicas do pólen. No entanto, ainda há a necessidade de mais estudos para conhecer as propriedades bioquímicas e funcionais da filoplanina do cacau. A versão truncada da filoplanina produzida foi utilizada como imunógeno para a produção de anticorpos a ser empregados em estudos funcionais da proteína no patossistema.

5. Referência Bibliográfica

ALMEIDA, D.S.M.; GRAMACHO, K.P.; CARDOSO, T.H.S.; MICHELI, F.; ALVIM, F.C.; PIROVANI, C.P. Cacao phylloplane: the first battlefield against *Moniliophthora perniciosa*, which causes witches' broom disease. **Phytopathology**, v. 102: 864-871. 2017.

ALMEIDA, D.S.M. **Identificação de proteínas do filoplano do *Theobroma cacao* L.** Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC. 2012.

ALVES, A.M.M.; MENEZES, S.P.; LIMA, E.M.; GRAMACHO, K.P.; ANDRADE, B. SILVA; FERREIRA, M.M. et al. The selenium-binding protein of *Theobroma cacao*: A thermostable protein involved in the witches' broom disease resistance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 142: 472–481. 2019.

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: 1012-1022. 2005.

BRITTO, D.S.; PIROVANI, C.C.; ANDRADE, B.S.; DOS SANTOS, T.P.; PUNGARTNIK, C.; CASCARDO, J.C.M. et al. Recombinant b-1,3-1,4-glucanase from *Theobroma cacao* impairs *Moniliophthora perniciosa* mycelial growth. **Molecular biology Reports**, v. 40(9): 5417-5427. 2013.

CAMILLO, L.R.; FILADELFO, C.R.; MONZANI, P.S.; CORREA, R.X.; GRAMACHO, K.P.; MICHELI, F.; PIROVANI, C.P. Tc-cAPX, a cytosolic

ascorbate peroxidase of *Theobroma cacao* L. engaged in the interaction with *Moniliophthora perniciosa*, the causing agent of witches' broom disease. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 73: 254-265. 2013.

CARDOSO, T.H.S.; FREITAS A.C.O.; ANDRADE B.S.; SOUSA A.O.; SANTIAGO A.S.; KOOPD.M. et al. TcCYPR04, a Cacao Papain-Like Cysteine-Protease Detected in Senescent and Necrotic Tissues Interacts with a Cystatin TcCYS4. **Plos One**, v. 10(12): e0144440. 2015.

DUMON-SEIGNOVERT, L.; CARIOT, G.; VUILLARD, L. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). **Protein Expression and Purification**, v. 37: 203–206. 2004.

EVANS, H. Witches' broom disease - a case study. **Cocoa Growers' Bull**, v. 32: 5-19.1981.

FREIRE, L.S. SANTANA, J.O.; DE SOUSA A.O.; DOS SANTOS, J.B.; DE OLIVEIRA, I.B.; ALVIM, F.A. et al. TcPHYLL, a cacao phylloplanin expressed in young tissues and glandular trichomes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 100: 126-135. 2017.

FREITAS, A.C.; SOUZA, C.F.; MONZANI, P.S.; GARCIA, W.; DE ALMEIDA, A.A.F.; COSTA, M.G.; PIROVANI, C.P. The Activity of TcCYS4 Modified by Variations in pH and Temperature Can Affect Symptoms of Witches' Broom Disease of Cocoa, Caused by the Fungus *Moniliophthora Perniciosa*. **PLos One**, v. 10(4): e0121519. 2015.

FRIEHS, K. Plasmid Copy Number and Plasmid Stability. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.86: 47–82. 2004.

FULTON, R.H. The cacao disease trilogy: Black pod, monilia pod rot and witches' broom. **Plant Disease**, v. 73: 601-603. 1989.

GIACALONE, M.J.; GENTILE, A.M; LOVITT, B. T.; BERKLEY, N.L.; GUNDERSON, C.W.; SURBER, M.W. **Toxic protein expression in *Escherichia coli* using a rhamnose-based tightly regulated and tunable promoter system.** **BioTechniques**, v. 40(3):355-364. 2006.

GONZALEZ, E.; MONSALVE, R.I.; PUENTE, X.S.; VILLALBA, M.; RODRÍGUEZ, R. Assignment of the disulfide bonds of Ole e 1, a major allergen of olive tree pollen involved in fertilization. **The Journal of Peptide Research**, v.55: 18-23.2000.

GRIFFITH, W.G.; NICHOLSON, J.; NENNINGER, A.; BIRCH, R.N.. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. **New Zealand Journal of Botany**, v. 41: 423-435. 2003.

GUAN, L.; LIU, Q.; LI, C.; ZHANG, Y. Development of a Fur-dependent and tightly regulated expression system in *Escherichia coli* for toxic protein synthesis. **BMC Biotechnology**, v.13(25). 2013.

HANNING, G.; MAKRIDES, S.C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**, v.16: 54-60. 1998.

HOCKNEY, R.C. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**, v. 12(11): 456-463. 1994.

JUDD, W.S. et al. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. Tradução André Olmos Simões et al. 3. ed. Artmed: Porto Alegre, 2009. p. 632.

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106: 803-822. 2018.

KIMELMAN A.; LEVY A.; SBERRO H.; KIDRON S.; LEAVITT A.; AMITAI G.; YODER-HIMES, D.R. et al. A vast collection of microbial genes that are toxic to bacteria. **Genome Research**, v. 22(9):1–8. 2012.

KING, B.; WILLIAMS, D.W.; WAGNER, G.J. Phylloplanins Reduce the Severity of Gray Leaf Spot and Brown Patch Diseases on Turfgrasses. **Crop Science**, v. 51: 2829-2839. 2011.

KWON, S.; KIM, S.K.; LEE, D.; KIM, J.F. Comparative genomics and experimental evolution of *Escherichia coli* BL21(DE3) strains reveal the landscape of toxicity escape from membrane protein overproduction. **Scientific Reports**, v. 5: 16076. 2015.

KROUMOVA A.B.; DIPAK M.; SAHOO K.; RAHA S.; GOODIN M.; INDU B.; MAITI I,B.; WAGNER G.J. Expression of an Apoplast-Directed, T-Phylloplanin-GFP Fusion Gene Confers Resistance against *Peronospora Tabacina* Disease in a Susceptible Tobacco. **Plant Cell Reports**, v.32: 1771-1782. 2013.

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: 1843–1851. 2007.

LASKOWSKI R A, MACARTHUR M W, MOSS D S & THORNTON J M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Cryst.**, 26, 283-291. 1993

MAINA, C.V.; RIGGS, P.D.; GRANDEA III, A.G.; SLATKO, B.E.; MORAN, L.S.; TAGLIAMONTE, J.A.; MEREYNOLDS, L.A.; GUAN, C. An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. **Gene**, v.74: 365-373. 1988.

MATTUPALLI C.; SPRAKER J.E.; BERTHIER E.; CHARKOWSKI A.O.; KELLER N.P.; SHEPHERD R.W. A microfluidic assay for identifying differential responses of plant and human fungal pathogens to tobacco phylloplanins. **Plant Health Progress**, v.15(3): 130-134. 2014.

MEINHARDT, L.W. et al. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? **Molecular Plant Pathology**, v. 9 (5): 577–588. 2008.

MENEZES, S.P.; SILVA, E.M.A.; LIMA, E.M.; DE SOUZA, A.O.; ANDRADE, B.S.; LEMOS, L.S.L. et al. The pathogenesis-related protein PR-4b from *Theobroma cacao* presents RNase activity, Ca²⁺ and Mg²⁺ dependent-DNase activity and antifungal action on *Moniliophthora perniciosa*. **BMC Plant Biology**, v.14: 161. 2014.

MIROUX, B.; WALKER, J.E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **Journal of Molecular Biology**, v.260: 289–298. 1996.

pET System Manual. Novagen, 2003. 68 p.

pMALProtein Fusion & Purification System: Instruction manual. New England Biolabs, 2017. 36 p.

PIROVANI CP, DA SILVA AS, DOS SANTOS LS, MICHELI F, MARGIS R, et al. *Theobroma cacao* cystatins impair *Moniliophthora perniciosa* mycelial growth and are involved in postponing cell death symptoms. **Planta**, v. 232: 1485–1497. 2010.

RAMACHANDRAN, G.N.; RAMAKRISHNAN C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of Polypeptide Chain Conformations. **Journal of Molecular Biology**, v.7:.95-99. 1963.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nat Protoc**, v. 5: 725–738. 2010.

SANTANA, J.O. et al. Witches' broom resistant genotype CCN51 shows greater diversity of symbiont bacteria in its phylloplane than susceptible genotype catongo. **BMC Microbiology**, v. 18: 194. 2018.

SAHOO D.K.; RAHA S.; HALL J.T.; MAITI I.B. Overexpression of the Synthetic Chimeric Native-T-Phylloplanin-GFP Genes Optimized for Monocot and Dicot Plants Renders Enhanced Resistance to Blue Mold Disease in Tobacco (*N. Tabacum* L). **The Scientific World Journal**, v. 2014: 1-12. 2014.

SHEPHERD, R.W. Phylloplanins: novel antifungal proteins on plant leaf surfaces. *Dissertação*. University of Kentucky, Lexington, 2004.

SHEPHERD, R.W. et al. Phylloplanins of tobacco are defensive proteins deployed on serial surfaces by short glandular trichomes. **Plant Cell**, v.17: 1851-1861. 2005.

SHEPHERD, R.W; WAGNER, G.J. Phylloplane proteins: emerging defenses at the aerial frontline? **Trends in Plant Science**, v.12 (2): 1360-1385. 2007.

SORENSE, H.P.; MORTENSEN, K.K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115: 113–128. 2005.

STEMESEDER T.; FREIER R.; WILDNER S.; FUCHS, J.E.; BRIZA, P.; LANG, R.; BATANERO, E. et al. Crystal structure of Pla I 1 reveals both structural similarity and allergenic divergence within the Ole e 1-like protein family. **J Allergy Clin Immunol**, v.140(1): 277-280. 2017.

STUDIER, W.F.; ROSENBERG, A.H.; DUNN, J.J.; DUBENDORFF, J.W. Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. **Methods in Enzymology**, v. 185: 60-89. 1990.

TOSARINI, T.R.; RAMOS, P.Z.; DE SOUZA, G.P.; BARONI, R.M.; MASSIRER, K.B; COUÑAGO, F.M.; MONDENGO, J.M.C. Cloning, expression and purification of kinase domains of cacao PR-1 receptor-like kinases. **Protein Expression and Purification**, v.146: 78-84. 2018.

XU, D.; ZHANG, Y. Improving the Physical Realism and Structural Accuracy of Protein Models by a Two-step Atomic-level Energy Minimization. **Biophysical Journal**, v. 101: 2525-2534. 2011.

XU, J.; ZHANG, Y. How significant is a protein structure similarity with TM-score=0.5? **Bioinformatics**, v. 26: 889-895. 2010.

YANG, J.; ZHANG, Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. **Nucleic Acids Research**, v. 43: W174-W181. 2015.

ZHANG, Y.; SKOLNICK, J. TM-align: A protein structure alignment algorithm based on TM-score, **Nucleic Acids Research**, v. 33: 2302-2309 (2005).

ZHANG, Y.; SKOLNICK, J. Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. **Proteins**, 57: 702-710 (2004).

5.CONCLUSÃO GERAL

O filoplano do cacau apresenta estruturas morfológicas, microorganismos e substâncias químicas que atuam na defesa inicial contra o patógeno *Moniliophthora perniciosa*. Assim, esta região é considerada o primeiro campo de batalha durante o início da interação *Theobroma cacao* x *M. perniciosa*. Ainda, proteínas específicas do mecanismo de germinação de *M. perniciosa* contribuem para o início da infecção e o desenvolvimento da doença. Dessa forma, o conhecimento da maneira como a proteção superficial do filoplano do cacau atua sobre as proteínas específicas do processo de germinação de *M. perniciosa* e suas vias de sinalização podem fornecer estratégias tecnológicas para prevenir doenças nas plantações de cacau.

O sistema de expressão heteróloga em *E. coli* não é eficiente para produzir a filoplanina completa do cacau, já que expressão da versão completa da proteína recombinante produz um efeito tóxico. Ainda, a versão truncada da filoplanina, contendo 30 resíduos de aminoácido do domínio tipo Ole e 1, foi expressa eficientemente na fração solúvel e insolúvel do extrato bacteriano. Assim, sugerimos que a parte funcional da filoplanina do cacau pode estar relacionada com o domínio tipo Ole e 1. Além disso, a similaridade entre a estrutura 3D de TcPHYLL com o molde 4z8wA - uma estrutura cristal da proteína alergênica do pólen (Pla I 1) da banana-da-terra inglesa (*Plantago lanceolata*) - sugere que seu domínio tipo Ole e 1 pode apresentar um nível de alergenicidade. Os anticorpos policlonais produzidos a partir da região carboxi não funcional da proteína, TcPHYLL^{Q84-T158}, podem ser utilizados em estudos funcionais da proteína no patossistema e em aplicações biotecnológicas, especialmente, aquelas que envolve o uso de peptídeos sintéticos na indústria farmacêutica