

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

JULIANA LELES COSTA

**Patogenicidade e regulação hormonal na interação
Moniliophthora perniciosa x *Solanum lycopersicum***

Piracicaba

2017

JULIANA LELES COSTA

**Patogenicidade e regulação hormonal na interação
Moniliophthora perniciosa x *Solanum lycopersicum***

Versão revisada de acordo com a CoPGr 6018 de 2011

**Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear
na Agricultura da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Biologia na Agricultura e
no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira
Figueira**

Piracicaba

2017

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Costa, Juliana Leles

Patogenicidade e regulação hormonal na interação *Moniliophthora perniciosa* x *Solanum lycopersicum* / Juliana Leles Costa; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Versão revisada de acordo com a CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

122 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Citocininas 2. Expressão gênica 3. Hormônios vegetais 4. Interação planta-patógeno 5. Tomate 6.Vassoura-de-bruxa I. Título

CDU 632.27 (577.17 : 635.64)

Aos meus pais, *Braulino e Anoilve*;

Ao meu irmão, *Virgilio*;

E ao meu esposo, *Fábio Ricardo*,

Por serem meu ‘porto seguro’, pelo amor incondicional e confiança,

DEDICO

À Deus e a Nossa Senhora,
por serem minha fonte de Água Viva,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Figueira, pela orientação, valiosos ensinamentos e principalmente pela confiança em mim depositada;

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de doutorado (2013/04309-6) e da bolsa de estágio de pesquisa no exterior (2016/10524-5);

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão do projeto de amparo à pesquisa (471631/2013-2);

Ao Prof. Dr. Piotr Mieczkowski da Universidade da Carolina do Norte (Chapel Hill) pela orientação e confiança durante o período de estágio no exterior;

Ao Dr. Paulo José Teixeira da Universidade da Carolina do Norte (Chapel Hill) pelo seu exemplo de ser humano e cientista, pelo conhecimento compartilhado, pelas valiosas discussões, pelas análises de bioinformática e pela oportunidade de participar das reuniões científicas do grupo do Prof. Dr. Jeff Dangl;

Ao Prof. Dr. Lázaro Perez, seus alunos e à técnica Cássia (ESALQ/USP) por contribuírem com os materiais vegetais e equipamentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho. Além disso, muito obrigada Prof. Lázaro pelo conhecimento compartilhado e valiosas discussões, fundamentais na minha formação acadêmica;

Às Dras. Isabel López-Díaz e Esther Carrera, e a técnica Teresa do Conselho Superior de Investigações Científicas e da Universidade Politécnica de Valencia pela orientação, confiança, discussões científicas e pela colaboração no desenvolvimento das análises de quantificação hormonal;

Ao Prof. Dr. Luciano Freschi do Instituto de Biociências da USP e a técnica Aline pela colaboração no desenvolvimento das análises de quantificação hormonal;

Ao Dr. Paulo Albuquerque (CEPLAC) pela confiança, valiosas discussões, pela orientação na condução dos experimentos com cacaueteiro e pela oportunidade de visitar um banco de germoplasma de cacaueteiro;

À Profa. Dra. Beatriz Appezzato e a técnica Marli (ESALQ/USP) pela disponibilidade de uso dos equipamentos para a histologia;

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopia Eletrônica Aplicada à Agropecuária-NAP/MEPA – ESALQ/USP pela disponibilidade da infra-estrutura para a execução deste trabalho;

Aos docentes da ESALQ e CENA pela enorme contribuição na minha formação;

Aos docentes supervisores de estágio no Programa PAE das disciplinas de Genética (LGN 0215) e Biologia Celular (LGN0114) do Departamento de Genética da ESALQ/USP pela confiança e pela enorme contribuição na minha formação;

À bibliotecária Marília pelas ajudas e correções e, aos funcionários da Biblioteca do CENA e ESALQ, pelo atendimento e atenção dispensada;

Aos Profs. Dr. Jorge Mondego, Juliana Ástua e Victor Vitorello pelas valiosas contribuições no exame de qualificação;

À Jamille Santos pelo seu exemplo de ser humana, pelo conhecimento e discussões científicas, pelas infinitas ajudas durante todo esse período e amizade. Muito obrigada por tudo! A nossa amizade foi fundamental...

À Mônica Rossi pela amizade, valiosos ensinamentos e disponibilidade de equipamentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho;

À Dra. Sandra Pierre (*in memoriam*) pelos ensinamentos com as bolachas, ajudas na coleta de vassouras e condução de experimento e, pelo seu entusiasmo e dedicação pelas doenças do cacaueteiro;

Aos amigos do *Moniliophthora*, Daniele Paschoal, Danielle Scotton e Juliana Deganello pela amizade, discussões científicas e ajudas nos experimentos; muito obrigada Dani P. pelas infinitas ajudas no final desse trabalho;

Aos amigos Aline, Letícia e Rodolfo pela amizade e pelas ajudas na condução dos experimentos;

Aos técnicos do Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP: Felipe Campana, Inês Possignolo, Paulo Cassieri, Raquel Orsi e Wlamir Godoy pela amizade e auxílio na execução deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Fabiano Martins (UFRB) pelos valiosos ensinamentos e por guiar meus primeiros passos na pesquisa;

Ao Dr. Eder Jorge de Oliveira (CNPMP) pela amizade, incentivos, valiosos ensinamentos e direcionamento para a 'vida acadêmica';

Aos alunos, ex-alunos e pós-doc do Laboratório de Melhoramento de Plantas, especialmente Albânia, Alessandra, André, Bruna Factor, Daniela Bardella, Deborah, Eduardo Bressan, Fernando, Flávia, Gabriela Juliano, Guilherme, Isabela, Joni, Karina, Layanne, Lucas, Luís Henrique, Marielli, Melissa, Nebó, Onildo, Renato, Roberto e Thaísa pelo convívio, confiança, troca de conhecimento, por tornarem meus dias mais alegres e produtivos e, principalmente pela amizade;

Aos amigos Sandra, Hilo e Wiliane pelo carinho, amizade, atenção e convívio;

Ao Prof. Dr. Agustin (UFV) e Dr. Geraldo pela troca de experiências e discussões científicas;

À Susana e a Sapna pela confiança, atenção e amizade durante o período que estive no exterior;

À todos meus amigos da graduação (UFRB), Embrapa (CNPMPF) e infância, especialmente, Eliana, Shirley, Jackeline, Gilmara, Raimundo, Jaqueline, Marla, Monara, Mônica, Talita e Uilma que mesmo distantes me acompanharam;

Aos meus familiares e afilhados, principalmente aqueles que se fizeram presentes pelo amor, paciência e atenção;

Aos meus sogros, Seu Fábio e D. Dulcinéa, e a Lucas pelo carinho, paciência e confiança;

À todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho,

MUITO OBRIGADA!

“If I have seen further it is by standing on the shoulders of Giants”.

Isaac Newton

RESUMO

COSTA, J. L. **Patogenicidade e regulação hormonal na interação *Moniliophthora perniciosa* x *Solanum lycopersicum***. 2017. 122 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

Moniliophthora perniciosa é o agente causal da doença vassoura-de-bruxa em cacaueteiro (*Theobroma cacao*). Os sintomas da doença compreendem perda de dominância apical, inchamento e excesso de brotações em ramos novos, reversão de meristemas florais em vegetativos, partenocarpia e lesões necróticas em frutos, sugerindo a ocorrência de alterações hormonais no hospedeiro. A disponibilidade de isolados do biótipo-S capazes de infectar o tomateiro, permitiu a utilização da cultivar miniatura ‘Micro-Tom’ (MT) como um modelo para estudo da interação *Moniliophthora perniciosa* x *Solanum lycopersicum*. Além de provocar sintomas característicos no MT, a disponibilidade de mutantes e linhas transgênicas introgrididos em MT, com alterações que afetam o metabolismo e sensibilidade hormonal, permitem investigar o papel dos hormônios vegetais no desenvolvimento dos sintomas. Inicialmente, foi avaliada a agressividade de três isolados do biótipo-S no MT, sendo que um isolado de Tiradentes apresentou maior agressividade, com maior incidência dos sintomas, maior engrossamento do caule, redução na altura das plantas, aumento no número de lóculos nos frutos e redução na biomassa radicular. Mutantes com alterações na percepção para auxina (*diageotropica* e *entire*) e uma linha transgênica expressando uma citocinina oxidase de *Arabidopsis* (*35S::AtCKX2*) diferiram para o engrossamento do caule e distribuição do número de lóculos nos frutos em relação ao MT. A linha transgênica *35S::AtCKX2* diferiu significativamente de MT com menor incidência de infecção. O engrossamento do caule associa-se ao aumento na área do córtex e, principalmente do xilema e floema. A aplicação exógena de citocinina sintética benzil-adenina (BA) e da auxina sintética ácido naftaleno acético (ANA) em MT evocam sintomas similares aos de plantas infectadas com *M. perniciosa*. Linhas transgênicas repórter de sinalização por citocinina (*ARR5::GUS*) ou auxina (*DR5::GUS*) indicaram sinalização diferencial por citocinina a 24 h e 36 h após inoculação (HAI) e 48 HAI por auxina. A infecção por *M. perniciosa* aumentou os níveis de ácido jasmônico, ácido salicílico (AS) e auxina em MT entre 5 d a 30 DAI, com maior incremento aos 5 DAI, enquanto que o nível de ácido abscísico aumentou aos 20 d e 30 DAI, e AS foi o único detectado em micélio dicariótico do biótipo-S. Genes de biossíntese de

citocinina (IPT), ativação (LOG), degradação (CKX) e resposta à citocinina (ARRs e CRF) e auxina (AUX/IAA, ARFs, SAUR e GH3) foram induzidos em MT inoculado de 12 h a 5 DAI, mas com maior acúmulo de transcritos aos 30 DAI. *M. perniciososa* induziu maior expressão desses genes citados e de biossíntese auxina, nos momentos iniciais da interação (12 h a 5 DAI) em *35S::AtCKX2* do que no MT. O efeito da infecção em aumentar o número de lóculos nos frutos parece ser independente ou *downstream* a mutação *fasciated*, *Mouse ears* e *ovate*. A mutação *Lanceolate* parece ter um papel na redução do efeito da infecção em aumentar o número de lóculos. Os resultados obtidos sugerem que a infecção pelo *M. perniciososa* em MT altere os níveis/sinalização dos hormônios vegetais, principalmente auxina e citocinina, provocando o engrossamento do caule (aumento no xilema, floema e córtex), redução no crescimento e na biomassa radicular e aumento no número de lóculos nos frutos.

Palavras-chave: Vassoura-de-bruxa. Biótipo-S. Citocinina. Auxina. Histopatologia. Expressão gênica.

ABSTRACT

COSTA, J. L. **Pathogenicity and hormonal regulation in the *Moniliophthora perniciosa* x *Solanum lycopersicum* interaction.** 2017. 122 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

Moniliophthora perniciosa is the causal agent of witches' broom disease in cocoa (*Theobroma cacao*). The disease symptoms comprise loss of apical dominance, thickening and proliferation of axillary shoots, shift from inflorescence into vegetative meristem, parthenocarpy and necrotic lesions on fruits, suggesting a host hormonal imbalance. The availability of an isolated of S-biotype *M. perniciosa*, which colonizes tomato, enabled the utilization of the miniature tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar 'Micro-Tom' (MT) as a suitable model to study the pathosystem *M. perniciosa* x *S. lycopersicum*. In addition to the characteristic symptoms of the infection in MT, the availability of mutants and transgenic lines introgressed into MT, with changes in plant metabolism and hormonal sensitivity, enable the investigation of the role of plant hormones in the development of symptoms. Initially, we evaluated the aggressiveness of three S-biotype *M. perniciosa* isolates. The isolate 'Tiradentes' showed greater aggressiveness infecting MT, with higher plant infection incidence, greater stem thickening, reduction in plant height, increase in fruit locule number and reduction in root dry weight. Mutants with altered auxin perception (*diageotropica e entire*) and the transgenic line expressing a cytokinin oxidase gene of arabidopsis (*35S::AtCKX2*) differed in stem thickening and fruit locule number distribution, as compared to MT. The transgenic line *35S::AtCKX2* differed significantly from MT, showing lower incidence of infection. The thickening of the stem may be related with an increase in area of the cortex, especially xylem and phloem. The exogenous application of synthetic cytokinin benzyl adenine (BA) and auxin naphthalene acetic acid (NAA) in MT induces similar symptoms to plants infected with *M. perniciosa*. Cytokinin (*ARR5::GUS*) and auxin (*DR5::GUS*) signaling reporter transgenic lines revealed differential cytokinin signaling 24 h e 36 h hours after inoculation (HAI) and differential auxin signaling in 48 HAI. Infection of MT by *M. perniciosa* increased the content of JA, SA and auxin during the development of symptoms from 5 d to 30 DAI, with greater increase at an early stage of symptoms development (5 days after inoculation – DAI), whereas abscisic acid content increased in 20 and 30 DAI, and only AS was detected in dicariotic mycelium of the S-biotype *M.*

perniciosa. Cytokinin biosynthesis (*IPT*), activating (*LOG*), and breakdown (*CKX*) genes and response to cytokinin genes (*ARRs* e *CRF*) and auxin (*AUX/IAA*, *ARFs*, *SAUR* e *GH3*) were induced in MT infected in 12 h a 5 DAI, with greater accumulation of transcripts in 30 DAI. *M. perniciosa* induced higher levels of *IPT*, *LOG*, *CKX*, *ARRs*, and *CRF* genes and auxin biosynthesis genes at an early stage of infection (12 h a 5 DAI) in *35S::AtCKX2*, as compared to MT. The effect of the infection on increasing fruit locule number seems to be independent or downstream *fasciated*, *Mouse ears* and *ovate* mutation. *Lanceolate* mutation seems to play a role in reducing *M. perniciosa* ability of increasing fruit locule number. The results suggest infection of MT by S-biotpye *M. perniciosa* alters levels/signaling of the hormones, especially auxin and cytokinin, inducing stem thickening (increasing xylem, phloem and cortex), reduction in plant height, root dry weight and increase in fruit locule number.

Keywords: Witches' Broom disease. S-biotpye. Cytokinin. Auxin. Histopathology. Gene expression.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Moniliophthora perniciosa, o agente etiológico da vassoura-de-bruxa do cacauero.....	20
2.2 Tomateiro cv. ‘Micro-Tom’ como modelo genético para estudo da patogenicidade do Moniliophthora perniciosa.....	23
2.3 O papel dos hormônios vegetais em interações planta x patógeno	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Produção de basidiósporos	33
3.2 Avaliações comparativa de sintomas e incidência entre três isolados de biótipo-S de M. perniciosa em MT.....	34
3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	35
3.4 Microscopia de Luz	36
3.5 Screening de mutantes e transgênicos hormonais inoculados com M. perniciosa biótipo-S	36
3.6 Seções transversais no caule.....	37
3.7 Aplicação exógena de citocinina (6-benzil-adenina - BA) e auxina (ácido naftaleno acético - ANA); e de inibidores de receptores de citocinina 6-(2,5-zihydroxybenzylamino)purine – LGR-991 e 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purine – PI-55	37
3.8 Ensaio histoquímico de indução por citocinina ou auxina empregando linhas transgênicas	38
3.9 Extração e quantificação dos hormônios vegetais (ácido abscísico, ácido jasmônico, ácido salicílico, auxina, citocininas e giberelinas)	39
3.10 Expressão temporal de genes de síntese e sinalização hormonal na interação MT x M. perniciosa biótipo-S.....	41
3.10.1 Desenho dos iniciadores	42
3.10.2 Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	43
3.10.3 Análise da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)	44

3.11 Sequenciamento massal de transcritos durante a interação do biótipo-S com MT e linha transgênica com baixos níveis de citocinina (35S::AtCKX2).....	45
3.12 Avaliações de sintomas e incidência em mutantes com alterações nos programas de meristema inoculados com <i>M. pernicios</i> a biótipo-S	46
3.13 Clonagem do gene IPT3 (Isopentenyl transferase)	46
3.14 Transformação de MT com o gene IPT3 (Isopentenyl transferase).....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Caracterização de isolados de <i>Moniliophthora pernicios</i> a biótipo-S	49
4.2 Resposta de mutantes e transgênicos hormonais à infecção pelo <i>M. pernicios</i> a biótipo-S.....	58
4.3 Histologia e quantificação da área do caule de MT, diageotropica, entre e 35S::AtCKX2 alterada em resposta à infecção pelo <i>M. pernicios</i> a biótipo-S.....	69
4.4 Resposta do MT à aplicação exógena de 6-benziladenina (BA), ácido naftaleno acético (ANA), 6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purine (LGR-991) e 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purine (PI-55) associado a infecção pelo <i>M. pernicios</i> a biótipo-S	73
4.5 Localização histoquímica da sinalização por citocinina e auxina.....	82
4.6 Quantificação dos hormônios vegetais [ácido abscísico (ABA), ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico (AS) e auxina]	86
4.7 Expressão diferencial de genes de síntese e sinalização de auxina e citocinina na interação Micro-Tom x <i>M. pernicios</i> a biótipo-S	92
4.8 Avaliação do número de lóculos de frutos nos mutantes com alterações de programas de meristema inoculados com o <i>M. pernicios</i> a.....	104
4.9 Clonagem do gene IPT3 de tomateiro.....	109
5 CONCLUSÕES	111
REFERÊNCIAS.....	113

1 INTRODUÇÃO

A vassoura-de-bruxa do cacauero (*Theobroma cacao* L.), causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005) [syn. *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer], é uma das principais doenças do cacauero, restrita à América do Sul e Caribe, sendo endêmica na região Amazônica (PURDY; SCHIMDT, 1996). Sua introdução em regiões produtoras de cacau provocou o colapso das lavouras no Suriname, Trinidad, Equador e Brasil (PURDY; SCHIMDT, 1996). O Sul da Bahia era umas das maiores áreas de produção de cacau antes da introdução da doença no estado, em 1989, e esta doença ainda é considerada um fator limitante à produção na região (ANDEBRHAN et al., 1999).

Moniliophthora perniciosa é um patógeno hemibiotrófico peculiar, que exibe um tipo de micélio em cada fase do seu ciclo de vida (PURDY; SCHIMDT, 1996; AIME; PHILLIPS-MORA, 2005). A infecção no cacauero ocorre por meio da penetração dos tubos germinativos, originados dos basidiósporos, em tecidos meristemáticos, ou seja, lançamentos foliares novos, almofadas florais ou frutos em desenvolvimento (PURDY; SCHIMDT, 1996; AIME; PHILLIPS-MORA, 2005). Os tecidos infectados apresentam sintomas de inchamento e excesso de brotações em ramos novos ('vassoura verde'), desenvolvimento de flores anormais e frutos parternocárpicos e o surgimento de manchas necróticas em frutos em desenvolvimento (PURDY; SCHIMDT, 1996; AIME; PHILLIPS-MORA, 2005). O ciclo da doença se completa quando as vassouras ou frutos tornam-se necrosados e produzem basidiocarpos, que liberam os basidiósporos, o único propágulo infectivo de *M. perniciosa* (PURDY; SCHIMDT, 1996; AIME; PHILLIPS-MORA, 2005).

Os sintomas da vassoura-de-bruxa no cacauero sugerem que a infecção causa uma alteração no balanço hormonal no hospedeiro. Além disso, o patógeno parece manipular o balanço através da síntese e/ou metabolização de hormônios a seu favor (TEIXEIRA et al., 2014). A estratégia com a qual *M. perniciosa* altera o balanço hormonal resultando nas alterações de desenvolvimento, observadas nos sintomas, são pouco elucidadas (TEIXEIRA; THOMAZELLA; PERREIRA, 2015).

Moniliophthora perniciosa pode infectar vários hospedeiros, sendo classificado em biótipos. Os isolados do biótipo-C causam doença no cacauero e outras espécies dos gêneros *Theobroma* e *Herrania* (subfamília Sterculiaceae) (GRIFFITH et al., 2003). O biótipo-L pode ser isolado de lianas e cipós, principalmente da família Bignoniaceae, e não induz o desenvolvimento de sintomas (GRIFFITH; HEDGER, 1994). Isolados do biótipo-S infectam

espécies do gênero *Solanum*, como solanáceas invasoras (jurubeba e lobeira) e, quando inoculados, solanáceas cultivadas (tomateiro e pimentão), induzindo sintomas característicos da doença (BASTOS; EVANS, 1985; MARELLI et al., 2009; DEGANELLO et al., 2014; PIERRE et al., 2017).

Deganello et al. (2014) demonstraram que a cultivar miniatura de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) ‘Micro-Tom’ (MT), desenvolvida por Meissner et al. (1997), é um modelo genético adequado para estudo do patossistema *M. perniciosa* x *S. lycopersicum*, visto que o biótipo-S de *M. perniciosa* provoca sintomas característicos no MT, como engrossamento do caule e pecíolo e perda da dominância apical. Outras características biológicas permitem classificá-lo como o modelo genético ideal para estudos na interação com esse fungo, como ciclo de vida curto e porte reduzido. Além disso, a disponibilidade de mutantes e linhas transgênicas introgridos na base genética de MT, com alterações que afetam o metabolismo e sensibilidade hormonal são uma ferramenta importante nos estudos genéticos e na compreensão sobre as funções dos hormônios vegetais nessa interação (CARVALHO et al., 2011).

Diante disso, propõe-se que o biótipo-S do *M. perniciosa* manipula o metabolismo/sinalização dos hormônios vegetais relacionados ao desenvolvimento do hospedeiro, e em consequência disso, a morfologia do caule e frutos de tomateiro são modificados. Sendo assim, os objetivos do presente trabalho foram:

1. Avaliar a agressividade de três isolados do biótipo-S utilizando basidiósporos obtidos de forma natural (vassouras secas) para o isolado Tiradentes e de forma artificial (método *pie-dish*) para os isolados APS1 e WMA5;

2. Identificar por meio de um *screening* de mutantes e linhas transgênicas, o(s) hormônio(s) vegetal(is) associado(s) ao desenvolvimento dos sintomas da infecção no tomateiro;

3. Identificar quais tecidos do caule são modificados pela infecção do biótipo-S de *M. perniciosa* e relacionar as alterações morfológicas no caule aos hormônios vegetais por meio de cortes histológicos e quantificação de área de tecidos do caule;

4. Simular ou reduzir os sintomas de infecção por meio da aplicação exógena de citocinina e auxina e de inibidores de receptores de citocinina na região similar à inoculada (ápice caulinar e gemas axilares);

5. Analisar a sinalização dos hormônios citocinina e auxina por meio de ensaios de localização histoquímica com duas linhas transgênicas contendo promotores indutíveis por

sinalização por citocinina (*ARR5::GUS*) ou auxina (*DR5::GUS*) fusionados pelo gene repórter *uidA (GUS)*;

6. Quantificar os hormônios vegetais durante o progresso da infecção no MT, mutantes com alterações na percepção à auxina (*diageotropica* ou *entire*) e linha transgênica com reduzidos níveis de citocinina (*35S::AtCKX2*);

7. Avaliar o perfil de expressão de genes relacionados à biossíntese e respostas aos hormônios citocinina e auxina durante o reconhecimento do patógeno e patogênese em MT e linha transgênica com reduzidos níveis de citocinina (*35S::AtCKX2*);

8. Avaliar se as mutações com alterações nos programas de meristema de tomateiro *fasciated*, *Lanceolate*, *Mouse ears* e *ovate*, estão relacionadas com o efeito do *M. perniciosa* na modificação dos frutos de tomateiro.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Moniliophthora perniciosa*, o agente etiológico da vassoura-de-bruxa do cacau

Moniliophthora perniciosa (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005) [syn. *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer] é um basidiomiceto hemibiotrófico pertencente à família Marasmiaceae, que apresenta morfologia e comportamento micelial distinto nas fases biotrófica e saprofítica (GRIFFITH et al., 1994). Esse fungo ocorre naturalmente na bacia amazônica, infectando diversos hospedeiros, como cacau e espécies afins, algumas espécies de solanáceas e lianas lenhosas (GRIFFITH et al., 1994).

O fungo *M. perniciosa* foi classificado em biótipos, uma vez que hospedeiros distintos são infectados pela mesma espécie. Os isolados do biótipo-C causam doença no cacau e outras espécies dos gêneros *Theobroma* e *Herrania* (subfamília Sterculiaceae) (ANDEBRHAN et al., 1995). O biótipo-L pode ser isolado de lianas e cipós, principalmente da família Bignoniaceae, colonizando tecidos vivos sem induzir sintomas (GRIFFITH; HEDGER, 1994). Isolados do biótipo-S infectam espécies do gênero *Solanum*, como tomateiro, pimentão, quando inoculados, e solanáceas invasoras (jurubeba e lobeira), induzindo sintomas característicos da doença (BASTOS; EVANS, 1985; MARELLI et al., 2009; DEGANELLO et al., 2014; PIERRE et al., 2017). Os biótipos -S e -C exibem homotalismo primário e causam sintomas similares em seus hospedeiros, sugerindo que eles adotaram estratégias de patogenicidade semelhantes. Por sua vez, o biótipo-L não causa sintomas da doença, e apresenta comportamento heterotático, com estratégia de reprodução cruzada (GRIFFITH; HEDGER, 1994; TEIXEIRA; THOMAZELLA; PERREIRA, 2015).

A vassoura-de-bruxa é uma das principais doenças que afeta o cacau (*Theobroma cacao* L.), restrita à América do Sul e Caribe, sendo endêmica na região Amazônica (PURDY; SCHIMDT, 1996). O aparecimento do fungo *M. perniciosa* em regiões produtoras de cacau provocou o colapso das lavouras no Suriname, Trinidad, Equador e Brasil (PURDY; SCHIMDT, 1996).

No final dos anos 1980, a introdução da doença no sul da Bahia, umas das maiores áreas de produção de cacau na época, levou a queda de 70% na produção de amêndoas de cacau no Brasil. A vassoura-de-bruxa ainda é considerada como um fator limitante à produção na região, transformando o Brasil de país tipicamente exportador em importador de cacau.

Aproximadamente três décadas após o surgimento da doença no Sul da Bahia, a produção de cacau no Brasil ainda não superou os efeitos negativos dessa enfermidade, atingindo em 2013 apenas 65% do que era produzido em 1989 (ANDEBRHAN et al., 1999; TEIXEIRA; THOMAZELLA; PERREIRA, 2015).

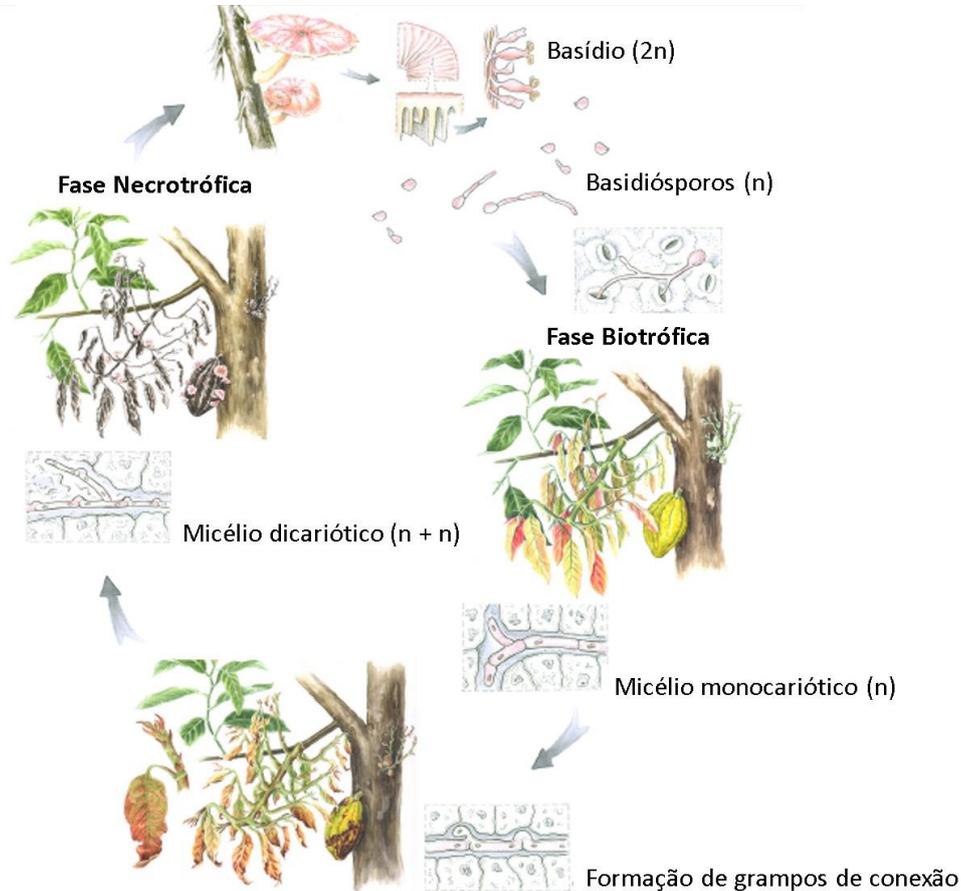
O ciclo de vida do *M. perniciosa* é considerado como atípico, quando comparado a outros microrganismos hemibiotróficos (*Magnaporthe oryzae* e *Colletotrichum* spp.) que, geralmente, apresentam um estágio biotrófico assintomático e curto. Já o *M. perniciosa* possui um estágio biotrófico longo (de um a três meses), no qual ocorre o desenvolvimento dos principais sintomas da doença (TEIXEIRA; THOMAZELLA; PERREIRA, 2015).

A infecção por *M. perniciosa* no cacaueiro ocorre por meio da penetração direta na base dos tricomas, ferimentos ou estômatos dos tubos germinativos originados dos basidiósporos em tecidos meristemáticos, ou seja, lançamentos foliares novos, almofadas florais ou frutos em desenvolvimento, através de ferimentos, estômatos ou diretamente pela epiderme sem a formação de haustórios (PURDY; SCHIMDT, 1996; AIME; PHILLIPS-MORA, 2005; SENA et al., 2014). Em seguida, ocorre o crescimento do micélio monocariótico de forma intercelular, com baixa densidade. Nessa fase, o patógeno consome nutrientes derivados do apoplasto, induzindo uma série de mudanças fenotípicas, como hipertrofia, hiperplasia, fototropismo e epinastia, presumivelmente causadas pelo desbalanço no metabolismo do hospedeiro (Figura 1) (PURDY; SCHIMDT, 1996; AIME; PHILLIPS-MORA, 2005; SENA et al., 2014; TEIXEIRA; THOMAZELLA; PERREIRA, 2015).

O crescimento hipertrófico de gemas infectadas, formando as ‘vassouras verdes’, consiste no sintoma mais característico da doença no cacaueiro. Além disso, a infecção em almofadas florais leva à reversão em ramos vegetativos, a produção de flores anormais e frutos partenocárpicos e, a infecção nos frutos causa manchas necróticas em frutos em desenvolvimento (PURDY; SCHMIDT, 1996; TEIXEIRA; THOMAZELLA; PERREIRA, 2015).

No final do ciclo, os tecidos infectados do hospedeiro sofrem necrose. Os micélios do fungo passam a crescer de forma intracelular e a exibirem grampo de conexão para a transferência de núcleo, formando hifas dicarióticas. O ciclo do patógeno se completa após 2 a 3 meses do início da infecção com a produção de basidiocarpos em vassouras necrosadas (vassouras secas) e frutos secos com alternância de períodos secos e úmidos. O ciclo se reinicia com a produção de basidiocarpos e a liberação de basidiósporos no ambiente, os quais consistem na única estrutura infectiva conhecida de *M. perniciosa* (Figura 1) (PURDY; SCHMIDT, 1996; TEIXEIRA; THOMAZELLA; PERREIRA, 2015).

Figura 1 – Ciclo de vida do *Moniliophthora perniciosa* em *Theobroma cacao*. Adaptado de Teixeira; Thomazella; Perreira, 2015



Os sintomas da infecção de *M. perniciosa* em cacauero sugerem uma alteração no metabolismo hormonal do hospedeiro. Acredita-se que esse patógeno manipule o balanço através da síntese e/ou metabolização de hormônios a seu favor (TEIXEIRA et al., 2014). No entanto, as estratégias utilizadas por *M. perniciosa* para alterar o balanço hormonal de seu hospedeiro, resultando nas más formações, ainda são pouco compreendidas.

Em ‘vassouras verdes’ de cacauero, a infecção por *M. perniciosa* induziu genes de resposta à auxina, biossíntese e resposta à giberelina e etileno e degradação/inativação de citocininas, evidenciando a forte sinalização dos hormônios vegetais no desenvolvimento dos sintomas (TEIXEIRA et al., 2014). Além disso, Scarpari et al. (2005) detectaram a produção do hormônio etileno em plantas de cacau infectadas. Os níveis das principais citocininas (zeatina, zeatina ribosídeo, isopenteniladenina e isopenteniladenosina) também foram investigados em cacaueros infectados por *M. perniciosa*, sendo que apenas a zeatina

ribosídeo apresentou um aumento significativo, embora ainda em baixos níveis, nas plantas infectadas com o fungo (ORCHARD et al., 1994).

Há evidências de que *M. perniciosa* produza hormônios vegetais. Por exemplo, a inspeção do genoma deste fungo levou à identificação de genes potencialmente envolvidos na síntese de ácido giberélico (MONDEGO et al., 2008), corroborando os resultados de Bastos; Andebrhan (1981), que detectaram indiretamente por bioensaios este hormônio em basidiósporos. Genes relacionados a vias biossintéticas da auxina ácido indol acético (IAA) também foram revelados no genoma do fungo (MONDEGO et al., 2008), sendo esse hormônio potencialmente responsável por induzir a xilogênese e a divisão celular, alterações mais notáveis durante a infecção por *M. perniciosa* (MARELLI et al., 2009). A produção de peroxidases e lacases pelo micélio de *M. perniciosa* em meio de cultura promove a destruição de auxinas, sugerindo que modificações no balanço entre IAA e suas oxidases causadas pelo fungo poderiam estar associadas à perda da dominância apical e proliferação das gemas axilares devido a degradação de auxinas (KRUPASAGAR; SEQUEIRA, 1969).

A habilidade de *M. perniciosa* em produzir e metabolizar ácido salicílico e auxina associados aos sintomas da doença fornece um indicativo da alteração do balanço específico dos hormônios vegetais no hospedeiro, que pode ser necessário para a patogenicidade (CHAVES; GIANFAGNA, 2006; KILARU et al., 2007). Foram identificados genes que codificam salicilato hidroxilases, que talvez explicaria a tolerância do fungo ao ácido salicílico (CHAVES; GIANFAGNA, 2006; KILARU et al., 2007).

2.2 Tomateiro cv. ‘Micro-Tom’ como modelo genético para estudo da patogenicidade do *Monilophthora perniciosa*

A vassoura-de-bruxa consiste numa interação entre dois organismos não-modelos: o fungo *M. perniciosa*, que possui um ciclo de vida atípico e o cacaueiro, uma espécie perene arbórea com ciclo de vida longo e recalcitrante ao cultivo *in vitro*. Essas características tornam esse sistema pouco atrativo para estudos de genômica funcional e manipulações genéticas (DEGANELLO et al., 2014; TEIXEIRA; THOMAZELLA; PERREIRA, 2015). Marelli et al. (2009), Deganello et al. (2014) e Pierre et al. (2017) mostraram que isolados do biótipo-S de *M. perniciosa* provocam sintomas da doença característicos no tomateiro, como engrossamento do caule e pecíolo e perda da dominância apical, abrindo uma nova perspectiva para entender a biologia desse patógeno em um organismo modelo.

A cultivar miniatura de tomateiro (*S. lycopersicum*) cv. 'Micro-Tom' foi proposta por Meissner et al. (1997) como modelo genético, semelhante a *Arabidopsis*. Deganello et al. (2014) demonstraram que MT é um modelo genético adequado para estudo do patossistema *M. perniciosa* x *S. lycopersicum*. Além da disponibilidade de isolados do biótipo-S que infectam o MT, outras características biológicas permitem classificá-lo como um modelo genético ideal para estudos genéticos, como: ciclo de vida curto, podendo produzir de três a quatro gerações por ano; porte reduzido de cerca de 15 cm de altura; capaz de crescer em altas densidades; metodologia de transformação genética otimizado, e coleção de mutantes introgridos em MT (PINO et al., 2010; CARVALHO et al., 2011). Outra característica importante, é o fato do tomateiro ser uma espécie diplóide, autógama com genoma pequeno de 950 Mb, distribuído em 12 cromossomos e completamente sequenciado (THE TOMATO GENOME CONSORTIUM, 2012).

Uma coleção de mutantes linhas transgênicas com alterações que afetam o metabolismo e sensibilidade hormonal, no mesmo *background* genético de MT, estão disponíveis e podem ser utilizados em estudos de interações bióticas e abióticas (CARVALHO et al., 2011). Diante disso, o uso do modelo MT no estudo da infecção por *M. perniciosa* disponibiliza ferramentas para entender os mecanismos de patogenicidade e defesa na interação em um menor tempo, suprimindo alguns obstáculos encontrados nas características biológicas do cacaueiro (MARELLI et al., 2009; DEGANELLO et al., 2014).

2.3 O papel dos hormônios vegetais em interações planta x patógeno

Os hormônios vegetais são essenciais na regulação do crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas (PIETERSE et al., 2012). Além disso, os hormônios têm um papel importante na sinalização de resposta contra estresses abióticos e bióticos (ROBERTSEILANIANZ et al., 2007). Em interações planta x patógeno, os fungos patogênicos, durante a invasão do hospedeiro e colonização, são alvos do padrão de sinalização desencadeado por hormônios, como o ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) ou etileno, os quais estão envolvidos, principalmente, na resposta de defesa. Outros hormônios vegetais, como auxina, ácido abscísico (ABA), citocinina e giberelina atuam nas respostas contra estresse biótico através da modulação do crescimento e alteração fisiológica nas plantas (PATKAR; NAQVI, 2017).

De modo geral, o AS promove a resistência contra patógenos biotróficos e hemibiotróficos, enquanto que o AJ/etileno atuam no mecanismo de resistência contra

patógenos necrotróficos (ROBERT-SEILANIANTZ; GRANT; JONES, 2011). Esse padrão de resposta do hospedeiro é geralmente antagônico, de modo que a ativação de um, suprime a ativação do outro. Os demais hormônios participam desse mecanismo de regulação via AS ou AJ/etileno (ROBERT-SEILANIANTZ et al., 2007; ROBERT-SEILANIANTZ; GRANT; JONES, 2011). Auxina e citocininas promovem a suscetibilidade em patógenos biotróficos, induzindo o padrão de resistência via AJ/etileno. Por outro lado, giberelinas induzem a suscetibilidade em patógenos necrotróficos através do mecanismo de resistência via AS (ROBERT-SEILANIANTZ et al., 2007).

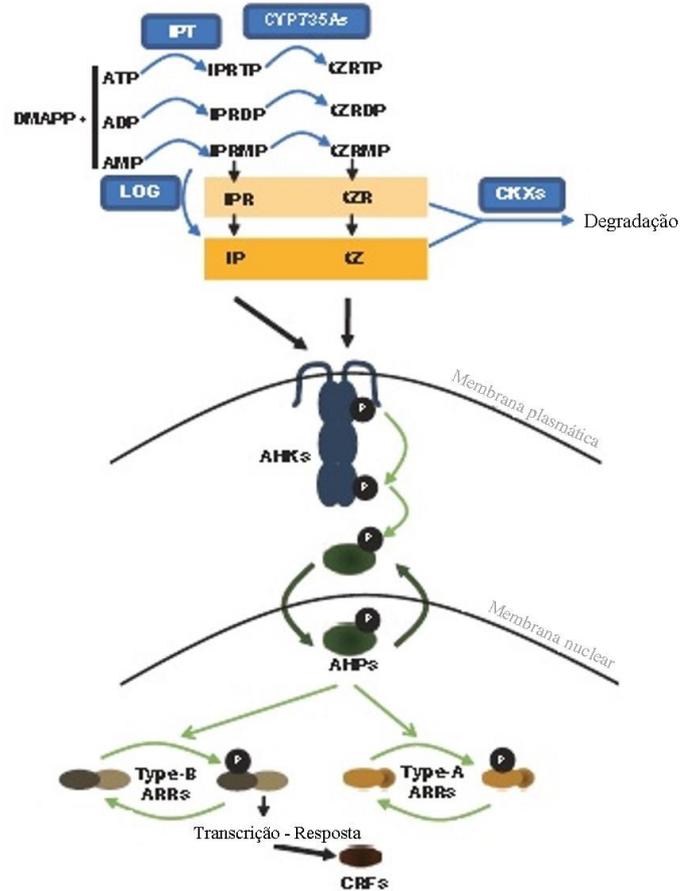
Durante o processo evolutivo, os patógenos desenvolveram a capacidade de manipular o padrão de sinalização dos hormônios vegetais a seu favor (KAZAN; LYONS, 2014). Algumas estratégias utilizadas pelos patógenos são: a supressão da biossíntese e/ou padrão de sinalização hormonal no hospedeiro; manipulação do padrão de sinalização hormonal no hospedeiro alterando as suas características fisiológicas, como abertura estomática e senescência, para favorecer a invasão e aquisição de nutrientes; e a produção de moléculas de baixo peso molecular, ‘semelhantes’ aos hormônios vegetais, para evadir o reconhecimento e a resposta imune do hospedeiro e auxiliar na progressão da doença (KAZAN; LYONS, 2014; CHANCLUD; MOREL, 2017; PATKAR; NAQVI, 2017).

Citocininas são derivadas de substituições no N⁶ terminal do anel aromático da molécula de adenina ou do padrão de degradação do tRNA, sendo classificadas como isoprenóides ou citocininas aromáticas (ARGUESO, FERREIRA, KIEBER, 2009). Essa classe hormonal regula diversos aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal, como: manutenção e diferenciação de meristemas apical caulinar e radicular, controle da divisão celular, desenvolvimento do cloroplasto, diferenciação vascular, atraso de senescência, modulação da relação fonte-dreno, aquisição de nutrientes e respostas a estresses abióticos e bióticos (ARGUESO, FERREIRA, KIEBER, 2009; ARGUESO, RAINES; KIEBER, 2010).

Citocininas isoprenóides são consideradas o tipo predominante em plantas e são sintetizadas pela ligação de um grupo isopentenil à molécula de ADP ou ATP, catalisada pela enzima *isopentenyl transferase* (IPT) (Figura 2) (KAKIMOTO, 2003). O produto resultante, ribosídeo isopenteniladenina (iP) pode ser convertido para a forma ativa pela enzima *lonely guy* (LOG), denominada de *cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase*, pertencente ao grupo das enzimas monooxigenases do citocromo P450 (Figura 2) (KURAKAWA et al., 2007). Os níveis endógenos de citocininas são regulados pelas enzimas *cytokinin oxidase/dehydrogenases* (CKXs), que por sua vez, degradam as cadeias laterais de citocininas na posição N⁶ em adenina ou adenosina (Figura 2) (HOUBA-HERIN, et al., 1999).

A transdução de sinal por citocinina em plantas envolve uma cascata de transferência de fosfato semelhante ao sistema de dois componentes bacteriano (ARGUESO; RAINES; KIEBER, 2010; KAKIMOTO, 2003). Esse sistema consiste de um sensor do tipo kinase (*histidine kinase* - HKs), que percebe o estímulo do ambiente e age como um receptor. A ligação da citocinina a HK resulta na autofosforilação e o sinal é transduzido para reguladores de resposta (RRs) por meio de proteínas fosfotransferases contendo histidina (HPs) (Figura 2) (DEL BIANCO; GIUSTINI; SABATINI, 2013). Os RRs propagam o sinal, frequentemente regulando a transcrição de genes alvos (DEL BIANCO; GIUSTINI; SABATINI, 2013). Os RRs podem ser agrupados em pelo menos duas classes dependendo do tipo de espécie vegetal (ARGUESO; FERREIRA; KIEBER, 2009; ARGUESO; RAINES; KIEBER, 2010). RRs do tipo-B agem como fatores de transcrição ativando a expressão de genes de resposta à citocinina, incluindo RRs do tipo-A e fatores de resposta à citocinina (CRFs) (Figura 2) (ARGUESO; FERREIRA; KIEBER, 2009; ARGUESO; RAINES; KIEBER, 2010). Por outro lado, RRs do tipo-A atuam como um *feedback* negativo que regula o padrão de sinalização por citocinina (ARGUESO; FERREIRA; KIEBER, 2009; ARGUESO; RAINES; KIEBER, 2010).

Figura 2 – Biossíntese de citocinina e sinalização. Adaptado de Argueso; Ferreira; Kieber, 2009



As citocininas têm um papel na indução da imunidade, como descrito por Argueso et al., (2012) em que, altas concentrações (10-100 μM) do hormônio induz a imunidade em *Arabidopsis* contra o patógeno biotrófico *Hyaloperonospora arabidopsidis* em um processo dependente de AS. Choi et al. (2010) demonstraram que o tratamento com 1 μM de *trans-zeatin* induziu o sistema imune de *Arabidopsis* contra a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

Por outro lado, as citocininas podem atuar na indução à susceptibilidade em interações planta x patógeno, por meio da redução da ativação das respostas de defesa do hospedeiro, manipulação dos níveis e/ou sinalização de citocininas *in planta* ou pela produção do hormônio pelo patógeno. Isso acarreta em mudanças nas respostas fisiológicas do hospedeiro, favorecendo a colonização do patógeno (ALBRECHT; ARGUESO, 2017; CHANCLUD; MOREL, 2017). Argueso et al. (2012) mostraram que baixos níveis (<1 μM) de citocinina

induziu a susceptibilidade em *Arabidopsis* contra o patógeno biotrófico *H. arabidopsidis*. Além disso, foi demonstrado que o agente causal da brusone do arroz, *Magnaporthe oryzae*, produz e secreta citocininas, alterando o metabolismo do hospedeiro no sítio de infecção e levando a um aumento nos níveis de açúcares e aminoácidos, os quais podem aumentar a susceptibilidade do hospedeiro (CHANCLUD et al., 2016).

Além do *M. oryzae*, muitos fungos biotróficos e hemibiotróficos produzem e secretam citocininas, como *Cladosporium fulvum*, *Blumeria graminis*, *Pyrenopeziza brassicae* e *Venturia inaequalis* (ROBERT-SEILANIANZ et al., 2007). No entanto, até o momento não foi identificado nenhum fungo necrotrófico que produz citocinina, sugerindo que a produção e secreção de citocinina por fungos dependem do estilo de vida do patógeno (ROBERT-SEILANIANZ et al., 2007; CHANCLUD; MOREL, 2017).

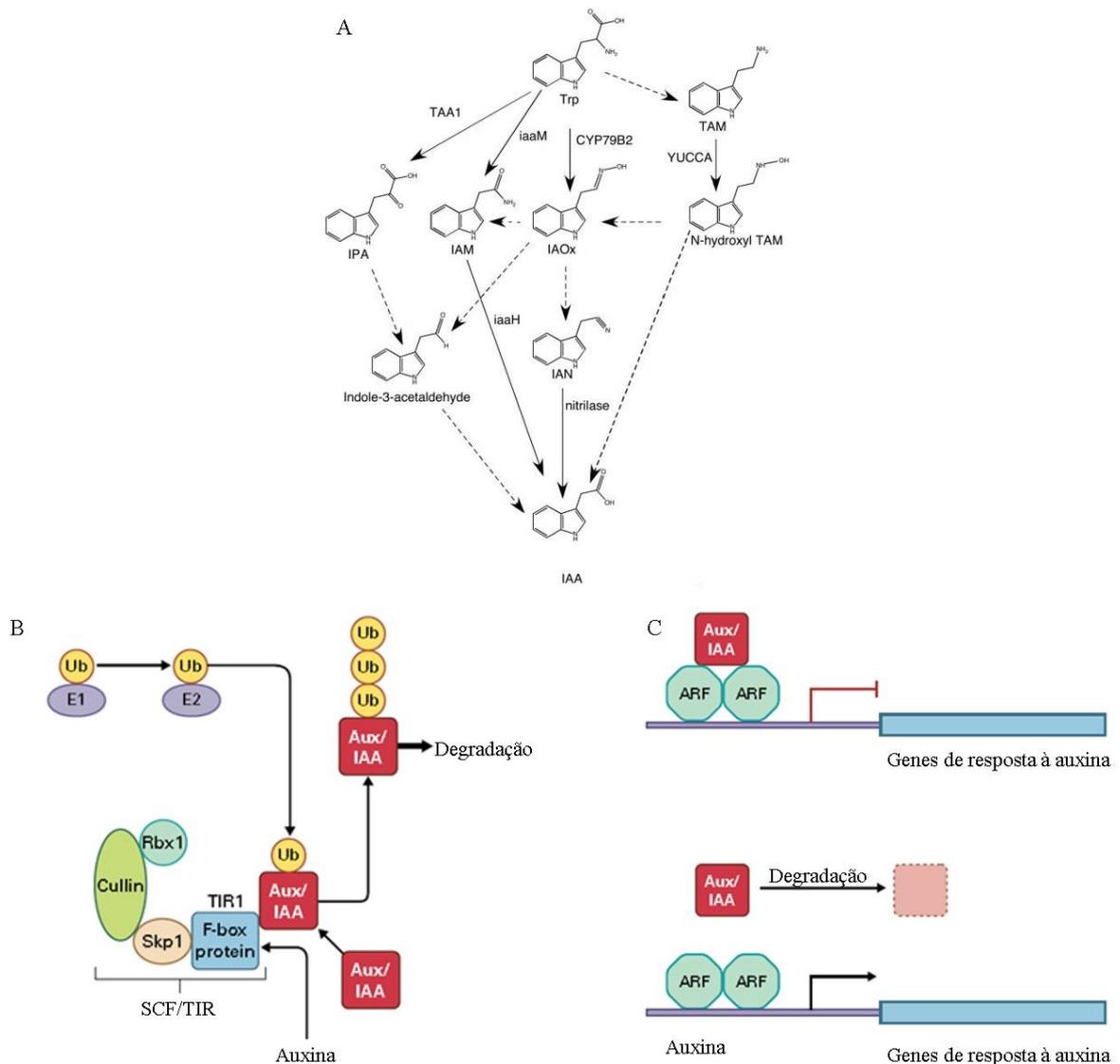
As auxinas são derivadas do ácido indol-3-acético (AIA) e, assim como as citocininas, têm um papel fundamental no desenvolvimento vegetal. Esse hormônio regula o processo de divisão celular, alongamento e expansão celular, manutenção e diferenciação de meristemas apical caulinar e radicular, formação e diferenciação de órgãos, senescência, diferenciação vascular e em respostas a estresses bióticos e abióticos. (MOUBAYIDIN et al., 2009; KAZAN; LYONS, 2014; CHANCLUD; MOREL, 2017).

Múltiplas rotas para biossíntese de auxina de forma dependente de triptofano foram identificadas em plantas, formando ácido indol-3-piruvico e triptamina como primeiros produtos (MOUBAYIDIN et al., 2009). Inicialmente, o L-triptofano é convertido em ácido indol-3-piruvico pela enzima *tryptophan aminotransferase* (TAM), seguido da conversão para AIA pela YUCCA, uma flavina contendo monooxygenase (Figura 3A) (MOUBAYIDIN et al., 2009). A triptamina é produzida pela descarboxilação do L-triptofano, por meio da enzima triptofano decarboxylase, seguido da conversão para indol-3-acetaldeído e, portanto, para AIA (Figura 3A) (MOUBAYIDIN et al., 2009).

A transdução de sinal intracelular de auxina envolve a ligação da auxina a membros de uma família de proteínas F-box que atuam como receptores, formando o complexo SCF/TIR (Figura 3B) (MOUBAYIDIN et al., 2009). Essa família de proteínas consiste de TIR (*TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT1*) e proteínas F-box de sinalização a auxina, AFB1, AFB2 e AFB3 (MOUBAYIDIN et al., 2009). Em seguida, o complexo SCF/TIR ligam moléculas de ubiquitina às proteínas repressoras AUX/IAA (*INDOLE-3-ACETIC ACID/AUX*), que promove sua degradação via ubiquitinação (Figura 3B) (MOUBAYIDIN et al., 2009, FU; WANG, 2011). A remoção e a degradação das proteínas AUX/IAA libera os

ativadores transcricionais ARF (*AUXIN RESPONSE FACTOR*) e esses induzem a transcrição de genes de resposta à auxina (Figura 3C) (MOUBAYIDIN et al., 2009).

Figura 3 – Biossíntese de auxina e sinalização. A: Rota de biossíntese de auxina. Adaptado de Zhao, 2010. B e C: Mecanismo de transdução de sinal em resposta à auxina. Adaptado de Leyser e Day (2015)



Fu e Wang (2011) propuseram um modelo para o padrão de sinalização por auxina em interações planta x patógeno, em que, após a inoculação, ocorre um acúmulo de auxina, sendo percebida pelo receptor TIR/AFB (*TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN FAMILY*). Esse receptor ativa a degradação do repressor AUX/IAAs (*Auxin/INDOLE-3-ACETIC-ACID*) e, em seguida, ocorre a indução dos ARFs

(*AUXIN RESPONSE FACTOR*), que podem induzir a biossíntese de AIA. Os níveis elevados de AIA na planta promovem mudanças fisiológicas, como expansão da parede celular e abertura dos estômatos, auxiliando no desenvolvimento da doença. Alguns membros de ARFs regulam positivamente a biossíntese de camalexina e negativamente a biossíntese de *indole glucosinolates*, resultando na resistência contra patógenos necrotróficos, como *Botrytis cinerea*, *Plectosphaerella cucumerina* e *Alternaria brassicicola*, e suscetibilidade a patógenos biotróficos, como *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas oryzae* e *Magnaporthe oryzae* (LLORENTE et al., 2008; FU; WANG, 2011; PATTEN; BLAKNEY; COULSON, 2013). A expressão de alguns genes da família GH3 (*Auxin-inducible GRETCHEN HAGEN*) também são induzidas por ARFs. GH3 sequestra AIA em uma forma conjugada que, por sua vez, inibe a ação de AIA na expansão da parede celular e abertura dos estômatos, conferindo resistência à planta (FU; WANG, 2011). Além disso, a sinalização por auxina age de forma antagônica ao padrão de sinalização por AS, mas atua de forma sinérgica ao padrão de sinalização via AJ/etileno, requeridos para a resistência contra patógenos necrotróficos (FU; WANG, 2011).

Auxinas também podem ser sintetizadas e secretadas por patógenos, atuando como fator de virulência ou como amplificador do efeito da virulência durante o desenvolvimento da doença (FU; WANG, 2011). O fungo biotrófico *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, agente causal da ferrugem do trigo e, o hemibiotrófico *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschyromene*, agente causal da antracnose, produzem e secretam auxinas durante o processo de colonização, as quais possuem um papel na patogenicidade (MAOR et al., 2004; YIN et al., 2014).

Além disso, as auxinas contribuem para a virulência de algumas bactérias, como *Agrobacterium tumefaciens* e *Pseudomonas savastanoi*, as quais secretam auxinas e citocininas, que por sua vez, irão induzir a formação de galhas ou tumores em seus hospedeiros (FU; WANG, 2011; PATTEN; BLAKNEY; COULSON, 2013). Alguns estudos demonstraram que as citocininas estão envolvidas na patogênese provocada por patógenos que induzem formação de galhas ou tumores em outros hospedeiros, como por exemplo: protistas – *Plasmodiophora brassicae* (SIEMENS et al., 2006), nematóides – *Heterodera schachtii* (SIDIQUE et al., 2015), bactérias – *Rodococcus fascians* (PERTRY et al., 2009); e fungos – *Ustilago maydis* (MILLS; VAN STADEN, 1978) e *Claviceps purpurea* (HINOSHI et al., 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados basidiósporos do biótipo-S do *M. pernicioso* obtidos de forma artificial (método *pie dish*), dos isolados APS1 (coletado de *Solanum lycocarpum*, conhecida como lobeira, em Viçosa, MG) e WMA5 (coletado de *S. rugosum*, conhecida como jurubeba, em Manaus, AM), que foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Gareth Griffith da Aberystwyth University no Reino Unido. Basidiósporos obtidos de forma natural também foram utilizados por meio da coleta de ramos secos (vassouras) de *S. lycocarpum* infectados por *M. pernicioso*, coletados em Tiradentes, MG (21°11'9.4"S, 44°19'15.8"W) (Figura 4A e B).

Sementes da cultivar Micro-Tom (MT), mutantes e linhas transgênicas com alterações nos níveis e percepção dos hormônios vegetais (ácido jasmônico, ácido salicílico, auxina, citocinina, etileno e giberelina) (Tabela 1) e mutantes com alterações em programas de meristema (Tabela 2) apresentando modificações na forma e número de lóculos nos frutos, introgridos na base genética de MT foram gentilmente disponibilizadas pelo Prof. Dr. Lázaro Peres, responsável pelo Laboratório de Controle Hormonal e Desenvolvimento Vegetal na ESALQ/USP, Piracicaba, SP para o desenvolvimento dos experimentos de interação com o biótipo S do *M. pernicioso* a fim de avaliar os sintomas da infecção e número de lóculos nos frutos.

Tabela 1 – Mutantes hormonais e linhas transgênicas introgrididos na cv. ‘Micro-Tom’ inoculados com isolado do biótipo-S de *M. perniciosa*

Mutantes	Classe*	Descrição/Fenótipo
<i>diageotropica</i>	AUX	Baixa sensibilidade à auxina. Defectivo para uma proteína ciclofilina (OH et al., 2006).
<i>entire</i>	AUX	Alta sensibilidade à auxina. Defectivo para <i>La2922</i> , um componente da via de transcrição de AUX (ZHANG et al., 2007).
<i>epinastic</i>	ET	Alta produção de etileno. Função gênica desconhecida (FUJINO et al., 1988).
<i>Never ripe</i>	ET	Baixa sensibilidade ao etileno. Defectivo para um receptor de etileno (WILKINSON et al., 1995).
<i>procera</i>	GA	Supersensível a giberelina. Mutação para perda de função do domínio de repressão das proteínas DELLA (BESSEL et al., 2008).
Transgênicos		
<i>35S::PS</i>	AJ	Altos níveis de ácido jasmônico. Superexpressão de prosisteminina, regulador positivo da via de sinalização de JA (MCGURL et al., 1994).
<i>35S::nahG</i>	AS	Baixos níveis de ácido salicílico. Expressão do gene <i>nahG</i> que catalisa conversão de AS para catecol (BRADING et al., 2000).
<i>35S::AtCKX2</i>	CK	Baixos níveis de citocinina. Superexpressão do gene <i>AtCKX2</i> (PINO et al., 2010).

* AUX = auxina; ET = etileno; GA = giberelina; AJ = ácido jasmônico; AS = ácido salicílico e CK = citocinina.

Tabela 2 – Mutantes de alteração de programas de meristema introgrididos na cv. ‘Micro-Tom’ inoculados com isolado do biótipo-S de *M. perniciosa*

Mutantes	Descrição/Fenótipo
<i>fasciated</i>	Aumento no número de sépalas, pétalas e carpelos durante o desenvolvimento floral resultante da regulação negativa do fator de transcrição tipo YABBY (CONG et al., 2008).
<i>Lanceolate</i>	Folhas simples e com margem inteira e redução no número de lóculos nos frutos. Este fenótipo é causado pela perda do sítio de regulação negativa do fator de transcrição do tipo TCP (<i>teosinte branched-cycloidea-proliferating cell factor</i>) pelo miR319, resultando na super expressão do TCP (ORI et al., 2007).
<i>Mouse ears</i>	Aumento da atividade meristemática produzindo folhas mais elaboradas além de modificações na estrutura floral devido à alta produção do fator de transcrição homeobox (<i>TKn2</i>) (CHEN et al., 1997).
<i>ovate</i>	Fruto alongado ou em forma de pêra resultante da interação proteína hidrofílica-proteína que leva a uma regulação negativa em genes envolvidos no crescimento do fruto (LIU et al., 2002).

3.1 Produção de basidiósporos

Vassouras secas de lobeira foram expostas ao regime de alternância de ciclo úmido (8 h) e seco (16 h), sob fotoperíodo de 12 h e temperatura média de 25 °C para produção de basidiocarpos do isolado Tiradentes (Figura 4C). Os isolados APS1 e WMA5 foram utilizados para produção de basidiocarpos numa matriz de vermiculita (método *pie dish* – GRIFFITH; HEDGER, 1993) a partir de *plugs* dos isolados cultivados em meio MYEA (30 g L⁻¹ agar; 5 g L⁻¹; extrato de levedura e 30 g L⁻¹ extrato de malte, pH 6,8). Assim, cinco *plugs* de ágar com o micélio foram colocados em sobre o meio MYEA (com o lado da hifa para cima) com 8 mL de água estéril e incubados por 14 dias à 25 °C no escuro. O micélio cresceu sobre a lâmina de água e no meio, conforme ilustrado na figura 5A.

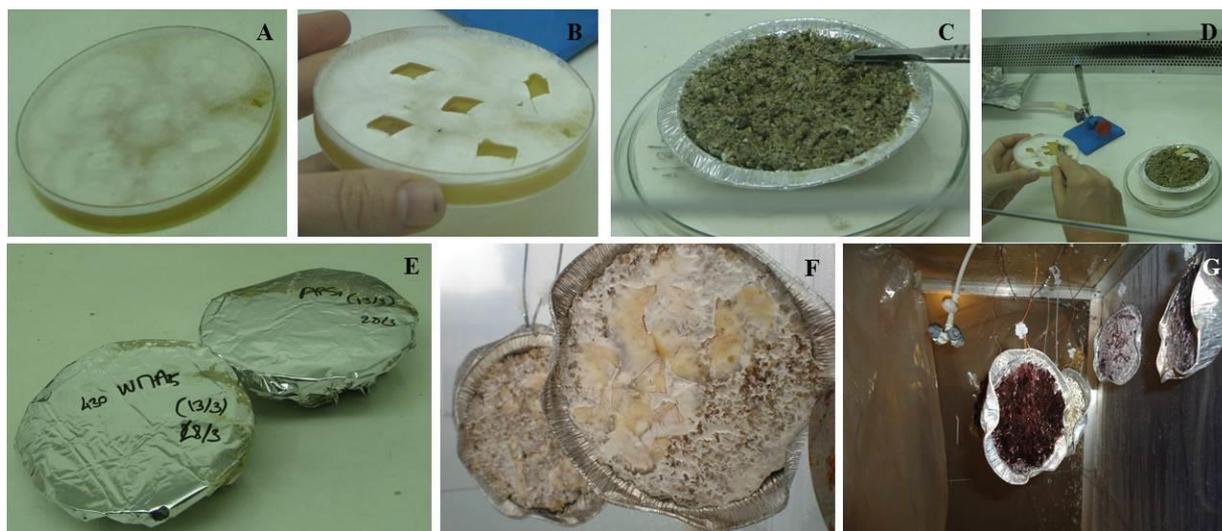
Após este período, foi preparado o *pie dish* contendo 8 g de vermiculita, 1,2 g CaSO₄ (H₂O)₂, 0,3 g CaCO₃, 10 g de *wheat biscuits* [contendo 94 % de farinha de trigo, extrato de cevada maltada, açúcar, sal, niacina, ferro, riboflavina (B2), tiamina (B1) e ácido fólico) produzido pela Wm Morrison Supermarkets PLC, Bradford, no Reino Unido] e 40 mL de água destilada. A matriz foi distribuída em prato de alumínio ‘marmitex’ (cerca de 40 g) (Figura 5C). O prato foi fechado com duas folhas de papel-alumínio e autoclavados por 15 min a 120 °C. O *pie dish* foi inoculado com *plugs* de micélio (Figura 5A-D), fechados com papel alumínio (Figura 5E) e mantidos a 25 °C no escuro por 3-4 semanas. Em seguida, o *pie dish* foi colocado em ‘vassoureira’ na casa-de-vegetação (Figura 5F-G) com 100 % de umidade nos primeiros 7 dias e depois com alternância de ciclo úmido (8 h) e seco (16 h) para induzir a produção de basidiocarpo.

Os basidiocarpos produzidos foram coletados e seus estipes foram removidos. Os píleos foram fixados por graxa de silicone na tampa de placas de Petri, mantendo as lamelas voltadas para o tampão de armazenamento (16% glicerol; 0,01 M MES, pH 6,1; 0,01% Tween 20), para liberação de basidiósporos. Após 16 h, a suspensão de esporos foi coletada e armazenada em tubos criogênicos em nitrogênio líquido. A concentração de basidiósporos foi estimada em Câmara de Neubauer no microscópio óptico Axiovert 35 (Zeiss; Alemanha). Para inoculação, a suspensão de esporos foi diluída em 3% de ágar:água para a concentração de 10⁶ esporos mL⁻¹.

Figura 4 – Lobeira (*Solanum lycocarpum*) infectada com *Moniliophthora perniciosa* em Tiradentes, Minas Gerais. Em A e B as plantas estão com abundância de vassouras secas. Em C, as vassouras secas foram expostas a regime de alternância de ciclo úmido (08 h) e seco (16 h) para produção de basidiocarpos



Figura 5 – Produção de basidiocarpos pelo método *pie dish* (GRIFFITH; HEDGER, 1993) com isolados do biótipo-S de *Moniliophthora perniciosa* (APS1 e WMA5)



3.2 Avaliações comparativa de sintomas e incidência entre três isolados de biótipo-S de *M. perniciosa* em MT

Sementes de tomateiro MT foram semeadas em bandejas para germinação contendo substrato PlantMax HT + vermiculita expandida (1:1) (detalhes em <http://www.esalq.usp.br/tomato/MMTCap2.pdf>). Após a germinação, as plântulas foram transferidas para câmara de crescimento, mantida a 25 °C, 80% de umidade relativa e 14 h de fotoperíodo. Após 17 dias da semeadura, as plantas foram inoculadas com basidiósporos de três isolados obtidos de duas formas: APS1 e WMA5 pelo sistema de *pie dish* (GRIFFITH;

HEDGER, 1993) e Tiradentes, MG a partir de ramos de *S. lycocarpum* (lobeira). A suspensão de basidiósporos (70 μL) de *M. pernicioso* de cada isolado, na concentração de 10^6 esporos mL^{-1} , foi depositada no ápice caulinar e gemas axilares do primeiro par de folhas de cada planta, e em seguida, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 h. O mesmo procedimento foi realizado nas plantas controles, mas a solução continha apenas 3% ágar:água. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (seis parcelas com 11 plantas, $n=66$).

As plantas foram avaliadas com 10, 20, 30 e 40 dias após a inoculação (DAI) para altura e diâmetro do caule utilizando um paquímetro. Aos 40 DAI foram estimadas as massas seca da raiz e parte aérea, a incidência da doença e o número de lóculos fruto⁻¹. Os dados de incidência foram transformados para $\sqrt{x+1}$ e submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey), utilizando o pacote estatístico *Statistical Analysis System – SAS* (SAS INSTITUTE, 1996). Além disso, aos 40 DAI foram coletados cinco fragmentos do caule abrangendo a área infectada e cinco fragmentos do caule no controle não-inoculado para microscopia eletrônica de varredura e luz, a fim de analisar a colonização pelos três isolados.

3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Cinco fragmentos de caule abrangendo a área infectada e cinco fragmentos de caule no controle não-inoculado coletados foram fixados em solução de Karnovsky modificada [2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 5 mM cloreto de cálcio em tampão 0,05 M cacodilato de sódio (pH 7,2)] por 8 d e mantidos a 4 °C. Foi utilizada a técnica de criofratura, na qual as amostras foram retiradas do fixador e colocadas em 30% glicerol durante 30 min, congeladas e seccionadas sob nitrogênio líquido. Em seguida, foram pós-fixadas em 1% tetróxido de ósmio por 1 h e desidratadas em série crescente de acetona (uma lavagem a 25%, 50%, 75% por 5 min cada, seguido de duas lavagens de 10 min a 90% e três lavagens de 20 min a 100%). Posteriormente, as amostras foram secas em aparelho de ponto crítico (EM CPD300 BALTEC, Leica, Viena, Áustria) utilizando CO_2 líquido. Os cortes longitudinais e transversais foram montados sobre suportes metálicos (*stubs*) e metalizadas com ouro durante 3 min. Os fragmentos das raízes foram visualizados no MEV (Zeiss Leo-425VP).

3.4 Microscopia de Luz

Cinco fragmentos de caule abrangendo a área infectada e cinco fragmentos de caule no controle não inoculado coletados foram fixados em solução de Karnovsky modificado durante 48 h, desidratados em série etílica crescente (35% a 100%). Posteriormente, foram transferidos para 100% propanol por 8 h seguido de 100% butanol *overnight*. A infiltração foi feita lentamente usando butanol: meio de infiltração (3:1, 1:1, 1:2) a 4 °C e finalmente meio de infiltração (Leica, Heidekberg, Alemanha) por 10 dias. A polimerização foi realizada em meio de infiltração e endurecedor à temperatura ambiente por 48 h, conforme recomendação do fabricante (Leica, Heidekberg, Alemanha). As secções histológicas (5 µm) foram obtidas em micrótomo rotativo RM2155 Leica e contrastadas com solução de 1% fucsina ácida em água e 1% azul de toluidina (FEDER; O'BRIEN, 1968). As secções contrastadas foram montadas utilizando lamínula e entelan. As amostras foram observadas ao microscópio ótico Leica LMD CTR 6500 e as imagens digitalizadas.

3.5 Screening de mutantes e transgênicos hormonais inoculados com *M. perniciosa* biótipo-S

As sementes de cinco genótipos mutantes (*diageotropica*, *entire*, *epinastic*, *Never ripe* e *procera*), três linhas transgênicas (*35S::PS*, *35S::nahG* e *35S::AtCKX2*) (Tabela 1) e MT foram semeadas em bandejas para germinação contendo substrato PlantMax HT + vermiculita expandida (1:1). Após a germinação e crescimento, as plantas foram transferidas para câmara de crescimento, mantida a 25 °C, 80% de umidade relativa e 14 h de fotoperíodo. Após 17 dias da semeadura, as plântulas foram inoculadas com basidiósporos. A suspensão de basidiósporos (70 µL) de *M. perniciosa*, obtidos de vassouras secas de lobeira, na concentração de 10^6 esporos mL⁻¹, foi depositada no ápice caulinar e gemas axilares do primeiro par de folhas de cada planta, e em seguida, as plantas foram mantidas sob câmara úmida por 48 h. O mesmo procedimento foi realizado nas plantas controles, mas a solução continha apenas 1% ágar:água. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (quatro parcelas com 10 plantas, $n=40$).

As plantas foram avaliadas aos 5, 15, 25 e 35 DAI para altura e diâmetro do caule com paquímetro. Aos 35 DAI, foram analisadas a incidência da infecção e o número de lóculos fruto⁻¹. Os dados de incidência foram transformados para $\sqrt{x+1}$ e as médias do diâmetro do caule por tratamento foram submetidas à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey), utilizando o pacote estatístico SAS - *Statistical Analysis System* (SAS INSTITUTE, 1996).

3.6 Seções transversais no caule

Plantas de MT, *diageotropica*, *entire* e *35S::AtCKX2* foram inoculadas com *M. perniciosa*, conforme descrito no item 3.5. Aos 35 DAI, regiões infectadas de três plantas de cada genótipo foram seccionadas e submetidas a cortes no micrótomo de deslize (SM2000R, Leica). Os cortes foram clareados com 50% hidróxido de sódio comercial e corados com 0,05% azul de toluidina e fotografados sob lupa (S8AP0, Leica, Heidelberg, Alemanha) e microscópio óptico (LMD CTR 6500, Leica). A área de cada tecido (medula, xilema, floema e córtex) foi quantificada a partir das imagens obtidas utilizando o programa ImageJ (SCHNEIDER et al., 2012). Em seguida, as médias das áreas de cada tecido foram submetidas à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey), utilizando o pacote estatístico SAS - *Statistical Analysis System* (SAS INSTITUTE, 1996).

3.7 Aplicação exógena de citocinina (6-benzil-adenina - BA) e auxina (ácido naftaleno acético - ANA); e de inibidores de receptores de citocinina 6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purine – LGR-991 e 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purine – PI-55

As soluções estoques de BA (1000 mM), ANA (1000 mM), LGR-991 (20 mM) e PI-55 (20 mM) foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO). LGR-991 e PI-55 são inibidores de citocinina sintéticos que bloqueiam os receptores de citocinina, *Arabidopsis Histidine Kinase 3 (AHK3)* e *Cytokinin Response 1 (CRE1)/AHK4* (LGR-991) (NISLER et al., 2010) e *CRE1/AHK4* (PI-55) (SPÍČHAL et al., 2009), os quais foram gentilmente cedidos pelo Prof. Lukás Spíchal da *Palacký University e Institute of Experimental Botany ASCR* na República Checa.

Em seguida, os hormônios e inibidores foram diluídos em pasta de lanolina, aquecida a 55 °C, na proporção de 99:1 (lanolina:DMSO). Plantas de MT foram inoculadas com *M. perniciosus*, conforme descrito no item 3.5 e dois dias após a inoculação as plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: 1) 12 µL de 20 mM BA; 2) 12 µL de 20 mM BA + 20 mM ANA; 3) 12 µL de 50 µM PI-55; 4) 12 µL de 50 µM LGR-991. Os hormônios e inibidores foram aplicados no ápice caulinar e gemas axilares do primeiro par de folhas de cada planta inoculada e controle (não inoculada). Nas plantas controle do experimento receberam o mesmo volume de pasta de lanolina, na mesma proporção (lanolina:DMSO). A aplicação exógena desses hormônios e dos inibidores dos receptores de citocinina foi repetida a cada dez dias (10, 20 e 30 dias após a primeira aplicação) utilizando o mesmo volume e concentração da primeira aplicação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (3 parcelas com 5 plantas, $n=15$).

As plantas foram avaliadas com 5, 15, 25, 35, 45 e 55 dias após a aplicação (DAA) para altura e diâmetro do caule com paquímetro. Aos 55 DAA, foram estimadas as massas seca da raiz e parte aérea, e o número de lóculos fruto⁻¹. As médias do diâmetro do caule aos 55 DAA foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey), utilizando o pacote estatístico *Statistical Analysis System – SAS* (SAS INSTITUTE, 1996). Três plantas de cada tratamento foram utilizadas para fazer os cortes histológicos, conforme descrito no item 3.6.

3.8 Ensaio histoquímico de indução por citocinina ou auxina empregando linhas transgênicas

Foram utilizadas duas linhas transgênicas que contém o gene *uidA* (GUS) sob o controle de promotores indutíveis por citocinina [*ARR5::GUS*, linha transgênica produzida pelo Prof. Dr. Lázaro Peres (ESALQ/USP) e a construção gênica foi cedida pelo Prof. Dr. Joseph J. Kieber (Universidade da Carolina do Norte, Chapel Hill, EUA)] ou auxina [*DR5::GUS*, linha transgênica produzida pelo Prof. Dr. Jose Luis Garcia-Martinez, Universidade Politécnica de Valencia, Espanha]. Os tecidos das plantas transgênicas foram imersos no tampão GUS [100 mM NaH₂PO₄.7H₂O pH 7,0; 10 mM EDTA pH 7,0; 0,5 mM K₃Fe(CN)₆ pH 7,0; 0,5 mM K₄[Fe(CN)₄].3H₂O pH7,0; 0,1% Triton X-100; 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide] e incubados a 37 °C. Inicialmente, foi realizado teste para identificar o tempo ideal de exposição ao tampão GUS para coloração. Assim, plantas com 18 dias após sementeira dos dois genótipos foram coletadas, expostas ao tampão e submetidas

a dois tratamentos: com vácuo e sem vácuo. Os tempos de exposição ao tampão a 37°C testados foram 1,5, 3, 6, 9, 12, 15 e 18 h. Após a incubação, a solução de coloração foi retirada com posterior adição de etanol 70% e mantidos nesta solução até a descoloração do tecido.

Em seguida, foi realizado o experimento para coletas ao longo do tempo após inoculação. Nas condições em que o experimento foi realizado, o preparo do material vegetal e inoculação foram idênticas as descritas no item 3.5. Foram realizadas coletas de cinco plantas inoculadas e cinco plantas controles (sem inoculação) aos 24 h, 36 h, 48 h, 5 d, 10 d, 20 d e 30 d após inoculação, colocadas no tampão, submetidas a vácuo por 5 min e incubadas a 37 °C por 12 h para as duas linhas transgênicas. Foi utilizado álcool 70% para clarear o tecido. Os tecidos das plantas foram fotografados em lupa (S8AP0, Leica). Este experimento foi realizado duas vezes de forma independente.

3.9 Extração e quantificação dos hormônios vegetais (ácido abscísico, ácido jasmônico, ácido salicílico, auxina, citocininas e giberelinas)

Plantas de MT e 35S::*AtCKX2* (Tabela 1) foram inoculadas com *M. perniciosa*, conforme descrito no item 3.5. A região do caule entre o primeiro e segundo par de folhas, acima das folhas cotiledonares, das plantas inoculadas e controles de três réplicas biológicas foi coletada nos períodos de 5, 10, 20 e 30 DAI e congelada em nitrogênio líquido. O material vegetal foi moído e mantido a -80°C até ser enviado em gelo seco para o laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal do Instituto de Biociências da USP, São Paulo, para a quantificação de auxina (AIA).

Entre 100 a 200 mg de massa fresca foi transferida para um tubo de centrífuga onde foi adicionado solução de extração contendo isopropanol:ácido acético (95:5). Em seguida, foi adicionado 0,25 µg [¹³C₆]-AIA_d e vortexado. As amostras foram então mantidas sob agitação no gelo por de 2 h no escuro. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 25.000 g a 4°C. O sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo e levado para secagem em speed-vac até restar apenas cerca de 50 µL em cada microtubo. Foi adicionado acetato de etila e água deionizada nas amostras, agitando em vórtex por 1 min e centrifugado por 5 min a 25.000 g a 4°C. Após a separação das fases, apenas a fase superior foi coletada e essa etapa foi repetida por mais duas vezes, sempre coletando a fase superior, e ao final, juntando todas as três frações extraídas em um mesmo microtubo. As frações

coletadas foram secas completamente utilizando speed-vac. Cada amostra foi ressuspensa em 200 μL de metanol, agitada e transferida para *vial* de CG e secas completamente em speed-vac.

Para derivatização de AIA, cada amostra foi ressuspensa em piridina e *N-tert-butyltrimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide* (MTBSTFA) pelo inserto do *vial* e agitadas intensamente por 5 min. Em seguida, as amostras foram incubadas no banho-seco por 1 h a 92 °C. Após a derivatização, todas as amostras foram injetadas no CG-MS (GCMS-QP2010 SE; Shimadzu, Kioto, Japão) em um modo de monitoramento íon seletivo. O cromatógrafo estava equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 MS (30 m, 0,25 mm diâmetro-0,25 μm *film*, Agilent, Santa Clara, CA, EUA) de fase estacionária usando hélio como gás transportador a um fluxo de 0,83 mL min^{-1} no seguinte programa: 2 min a 100 °C, seguido de aumento de 10 °C min^{-1} até 140 °C, 25 °C min^{-1} a 160 °C, 35 °C min^{-1} a 250 °C, 20 °C min^{-1} a 270 °C, e 30 °C min^{-1} a 300 °C. A temperatura do injetor foi de 250 °C, e os seguintes parâmetros operacionais de espectrometria de massa foram utilizados: tensão de ionização a 70 eV (ionização de impacto de elétrons); temperatura da fonte de íons a 230 °C; e interface de temperatura a 260 °C. As concentrações endógenas foram calculadas com base em cromatogramas extraídos.

Posteriormente, foi realizado outro experimento para quantificação de outros hormônios vegetais, incluindo ácido abscísico (ABA), ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico (AS), auxina, citocininas e giberelinas. Plantas de MT, *diageotropica*, *entire* e *35S::AtCKX2* (Tabela 1) foram inoculadas com *M. perniciosa*, conforme descrito no item 3.5. A região do caule entre o primeiro e segundo par de folhas, acima das folhas cotiledonares, das plantas inoculadas e controles de cinco réplicas biológicas foi coletada nos períodos de 5, 10, 20 e 30 DAI para MT e 30 DAI para os demais genótipos citados acima, totalizando 70 amostras. O micélio dicariótico de *M. perniciosa* também foi utilizado para a quantificação dos hormônios citados acima. *Plugs* de ágar contendo o micélio do isolado Tiradentes foi cultivado em meio MYEA (5 g L^{-1} ; extrato de levedura e 30 g L^{-1} extrato de malte, pH 6,8) por 15 d a temperatura ambiente, sem agitação e no escuro. Após esse período, a massa de micélio foi coletada em cinco réplicas biológicas com auxílio de uma pinça e secas em papel toalha. O material vegetal e o micélio coletado foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido até o processo de moagem. Após a moagem, o material foi liofilizado e mantido na geladeira até a extração. Estas amostras foram levadas para o laboratório de Metabolismo Hormonal de Plantas do Instituto de Biologia Molecular de Plantas do CSIC-Universidade Politécnica de Valencia na Espanha para a quantificação dos hormônios.

No laboratório, entre 25 e 30 mg de tecido moído e liofilizado foi utilizado para a extração dos hormônios vegetais. As alíquotas foram homogeneizadas em 80% metanol-1% ácido acético, contendo os padrões internos deuterados, e misturadas em *shaker* por uma hora a 4 °C e mantidos a -20 °C *overnight*. Em seguida, utilizou-se a coluna Oasis HLB (fase reversa) (Waters, Milford, MA, EUA) para filtrar o extrato, conforme descrito por Seo et al. (2011). A coluna foi eluída em 95% metanol-1% ácido acético e o extrato foi seco em *speed-vac*. O eluído seco foi dissolvido em 5% acetonitrila-1% ácido acético e uma alíquota foi utilizada para quantificar AS. A outra alíquota foi utilizada para passar na coluna Oasis MCX (troca catiônica) (Waters), em que o extrato foi eluído 100 % metanol e seco em *speed-vac*. O eluído seco foi dissolvido em 5% acetonitrila-1% ácido acético e utilizado para quantificar ABA, AJ, auxina e giberelinas. A amostra retida na coluna MCX foi utilizada para quantificar as citocininas, sendo eluída em 60% metanol-5% amônia, seco em *speed-vac* e o eluído seco foi dissolvido na mesma solução utilizada para quantificar os demais hormônios. Os hormônios foram separados em cromatografia UPHL (Accucore RP-MS column 2.6 µm, 50x2.1 mm, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) com gradiente de 5 a 50% acetonitrila, contendo 0,05% de ácido acético a 400 µL min⁻¹ por 14 min. A quantificação dos hormônios foi realizada por espectrometria de massas (Q-Exactive; Orbitrap detector; ThermoFisher Scientific) com hormônios deuterados [²H] como padrões internos, em que se utilizou as curvas de calibração e os programas *Xcalibur 2.2 SPI build 48* e *TraceFinder* para quantificar os hormônios. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey), utilizando o pacote estatístico *Statistical Analysis System – SAS* (SAS INSTITUTE, 1996).

3.10 Expressão temporal de genes de síntese e sinalização hormonal na interação MT x *M. pernicios*a biótipo-S

O ápice caulinar das plantas de MT inoculadas e controles foram coletados nos períodos de 6, 12, 24, 48, 96 e 144 h após inoculação em triplicatas biológicas. As condições em que o experimento foi realizado, o preparo do material vegetal e a inoculação foram idênticas as descritas no item 3.5. O material coletado foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido e armazenado em ultrafreezer para extração posterior do RNA.

3.10.1 Desenho dos iniciadores

Os genes selecionados foram analisados nas ferramentas *on-line* <http://gbf.toulouse.inra.fr/tomexpress> e <http://tomatolab.cshl.edu/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi> para identificar se havia expressão no ápice caulinar e caule de tomateiro. Em seguida, foi utilizado o programa *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) para o desenho dos iniciadores (Tabela 3). Foram desenhados iniciadores para aqueles genes com expressão preferencial para o tecido alvo (ápices caulinares e caule). A estabilidade dos iniciadores foi verificada pelo programa *NetPrimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>).

Tabela 3 – Lista de genes de tomateiro relacionados à síntese e sinalização hormonal, sequência dos iniciadores e o número de acesso

Gene	Iniciadores (5' - 3')	Acesso
<i>Indole-3-acetic acid/Aux</i> (AUX/IAA1)	GAAAATGTTCAAGCTGAGTATC CTGATCCTTTCATTATCCTTAG	AF022012
<i>Indole-3-acetic acid/Aux</i> (AUX/IAA9)	AAGGCACAGGTTGTTGGTTGG CAGGTTCTGAGGTCCACTTCC	Solyc04g076850
<i>Indole-3-acetic acid/Aux</i> (AUX/IAA27)	CCAAAAAGAGGGAATGGAGGTT TGTTCTCCCTTCATCATCATTTTTTC	Solyc03g120500.2.1
<i>Auxin response factor (ARF2A)</i>	GCAAGGTCAAGAGTTATCGA CATTGGTTTCTCAGACAAGTC	Solyc03g118290.2.1
<i>Auxin response factor (ARF2B)</i>	CACTTAATCCACTTCCAATACC TACAACACTTTGGATGAACCT	Solyc12g042070.1.1
<i>Auxin response factor (ARF4)</i>	CATTATTGTTGGTGACTTTGTG GACCTTTGGAAACCTATTGG	Solyc11g069190.1.1
<i>Auxin response factor (ARF8)</i>	CTGCTCAAACCCAAATGCTGTC GGTAAGTGTGTTGGTGAGCCTG	Solyc02g037530.2.1
<i>Auxin response factor (ARF10)</i>	CAGGTCCAGCAGTCCTTTCT CGCTGGAAACTTGGTGGTAA	NM_001247867
<i>Auxin-induced SAUR-like protein (SAUR4)</i>	CGGTCACTAACTTCAATGCTTCG GCCATCCTTGTTCACTCCAC	Solyc01g110570
<i>Isopentenyl transferase (IPT3)</i>	TTTCGCGGTGAAAACTTCT TGCAAGAAGGAAGTTGACGA	AK329766
<i>Lonely guy (LOG1)</i>	TGGCAAAGAATTGGTGTCAA GCAACAGCCTTCACTTCTCC	Solyc10g084150.1.1
<i>Lonely guy (LOG5)</i>	CATGTTGCTCCCCATGAAA TGGAGACTGCTCCTTTGGAT	AK323270

3.10.2 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Todos os materiais utilizados no processo da extração de RNA foram lavados com água tratada com 0,01% de dietilpirocarbonato (DEPC) por 2 h na capela, autoclavados a 120 °C por 20 min e secos em estufa (80 °C). Todas as soluções utilizadas na extração de RNA foram preparadas com água 0,01% DEPC inativa (autoclavada). O RNA total foi extraído do ápice caulinar de tomateiros inoculados e controles utilizando Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Assim, 100 mg de tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e transferido para um tubo de centrífuga de 2 mL, com adição de 1 mL de Trizol e posterior homogeneização em vortex. Após a homogeneização, foi feita uma incubação de 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se uma centrifugação a 9.000 g por 15 min a 4°C. Posteriormente, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, sendo adicionados 200 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após 5 min em temperatura ambiente, foi realizada uma nova centrifugação a 9.000 g por 15 min a 4°C. A fase superior foi coletada para um novo microtubo e foram adicionados 500 µL de isopropanol. Em seguida, foi feita uma incubação de 10 min e centrifugação a 9.000 g por 10 min. O *pellet* foi lavado duas vezes com etanol 75%, centrifugado 9.000 g por 6 min a 4°C e ressuspenso em 20 µL de água DEPC e armazenados a -80 °C.

Para verificar a integridade e a concentração de RNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel 1% agarose e leitura em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). Após a quantificação, cerca de 2 µg do RNA extraído de cada amostra foi tratado com 2 U DNase I (Fermentas, Waltham, MA, EUA), 40 U de Ribolock RNase Inhibitor (Fermentas), tampão da DNase e água estéril tratada com 0,01% DEPC para completar um volume final da reação de 10 µL. A reação foi incubada no termociclador modelo Veriti Dx (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) a 37 °C por 30 min. Para a inativação da enzima, adicionou-se 2 µL de 25 mM EDTA, incubando a 65 °C por 10 min, seguido de resfriamento a 4 °C. Em seguida, a metade do volume do RNA total tratado foi utilizado para a síntese de cDNA.

A síntese de cDNA foi conduzida utilizando 1 µg de RNA total, 1 mM de cada dNTP, 5 µM *primer* poli-T (oligo-dT 18 pb), seguida de incubação à 65 °C por 5 min e resfriado à 4 °C por 5 min. A transcrição reversa foi conduzida numa reação contendo tampão da enzima 5X *RT Buffer* (Fermentas), 200 U de *RevertAid Premium Reverse* (Fermentas)

e 20 U de Ribolock RNase Inhibitor (Fermentas) com volume final da reação 20 µL. A reação de transcrição reversa foi incubada a 50°C por 30 min, 85°C por 5 min e armazenados a -20°C.

3.10.3 Análise da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

Para detectar o fungo nas amostras inoculadas que certifica o sucesso da infecção, as reações de amplificação foram realizadas em volume final de 10 µL utilizando-se 1 µL de cDNA (sem diluição); 0,5 µM dos iniciadores de *RpL 35* de *M. perniciosa* (5' ACTTCGGGTGCAAAAGATTG 3'; 5' TGGTCCTTCTTCGTCTGCTT 3') e 5 µL de *Platinum SYBR-green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen). As amplificações foram conduzidas no termociclador *RotorGene 3000* (Corbett Research, Austrália) com incubações iniciais a 50 °C por 2 min, 95 °C por 2 min e seguidas de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 30 s, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. Após o término dos ciclos de reações, foram determinadas as curvas de dissociação de cada produto amplificado entre 72 °C e 95 °C (curva de *melting*). Duplicatas técnicas de cada amplificação foram realizadas e os experimentos incluíram controle negativo contendo água sem cDNA e cDNA do fungo *M. perniciosa* cultivado *in vitro* (controle positivo). Para analisar a expressão dos genes alvos de tomateiro associados à biossíntese e resposta aos hormônios vegetais (Tabela 2), as condições de amplificação foram as mesmas descritas anteriormente, porém nesse caso foi utilizado o cDNA diluído 10⁻¹. Duplicatas técnicas de cada amplificação foram realizadas e os experimentos incluíram controle negativo contendo água sem cDNA e um *pool* de amostras de RNA tratado com DNase.

A aquisição dos dados em tempo real foi efetuada com o programa *RotorGene Real-Time Analysis 6.0* (Corbett Research), o qual forneceu os valores de ciclo de quantificação (C_Q) para análise da expressão gênica do tratamento (inoculado) em relação ao controle, sendo normalizados com dados de dois genes de referência (*PPA2Acs* - *protein phosphatase 2A catalytic subunit* e *tubulin* (β -*tubulin*)). Para isso, foi utilizado o programa *Relative Expression Software Tool* (REST-2009), disponível em <http://www.gene-quantification.com/rest.html> de acordo com Pfaffl et al. (2002).

3.11 Sequenciamento massal de transcritos durante a interação do biótipo-S com MT e linha transgênica com baixos níveis de citocinina (*35S::AtCKX2*)

Para investigar genes relacionados à patogênese e de resposta de defesa, a linha transgênica *35S::AtCKX2* (Tabela 1) e o MT foram cultivados e inoculados como descrito no item 3.5 para o sequenciamento dos transcritos. O ápice caulinar das plantas inoculadas e controles de cinco réplicas biológicas foram coletados nos períodos de 12 h, 24 h, 48 h, 5 d, 10 d e 30 DAI para *35S::AtCKX2* e MT. O material coletado foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído do ápice caulinar de tomateiros inoculados e não inoculados (controle) utilizando Trizol (Life Technologies). O RNA total foi enviado para *High-Throughput Sequencing Facility* da Universidade da Carolina do Norte em Chapel Hill, EUA, onde foi realizado o preparo das bibliotecas, o sequenciamento do RNA e análises de bioinformática.

A qualidade do RNA total e a quantificação foi realizada no *RNA LabChip Caliper* (Perkin Elmer, Hopkinton, MA, EUA). As bibliotecas dos genótipos *35S::AtCKX2* e MT foram preparadas em cinco réplicas biológicas nos dois tratamentos (controle e inoculado) conforme citado acima para cada tempo de coleta após inoculação, totalizando 120 bibliotecas. As bibliotecas de cDNA foram construídas a partir de RNA mensageiro (poliadenilado) contido em 1 µg do RNA total utilizando o kit *KAPA Stranded RNA-Seq Illumina Platforms*, conforme recomendações do fabricante (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EUA), com média do tamanho do inserto de 200-300 pb e *dual adapter* (2D, Truseq RNA adapter plate, Illumina). A qualidade da biblioteca foi analisada no DNA 1K LabChip Caliper (Perkin Elmer). Assim, após o controle de qualidade, cada biblioteca foi normalizada para 15 nM e preparadas para o *pooling*. As 120 bibliotecas foram separadas em três *pools*, no qual, a concentração e o tamanho foram verificados em fluorímetro (Qubit, Life Technologies) e Experion 1K DNA chip (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), respectivamente. Cada *pool* foi sequenciado em uma *lane* da *flowcell* em *reads single-end* 50 pb no sequenciador HiSeq 4000 da Illumina (San Diego, CA, EUA).

A qualidade dos *reads* obtidos foi inicialmente inspecionada utilizando-se a ferramenta FastQC. Em seguida, os *reads* foram trimados para a retirada de adaptadores, artefatos do sequenciamento e fragmentos com baixa qualidade com o programa Trimmomatic (BOLGER et al., 2014). Os *reads* trimados foram então mapeados contra os genomas do cloroplasto, mitocôndria e o cluster de DNA codificante dos fragmentos do ribossomo do tomate para retirada dos *reads* que mapearam nestas sequências (contaminantes

não poli-adenilados). Os *reads* filtrados de cada uma das bibliotecas foram mapeados contra o genoma de referência do tomateiro ITAG3.1 (THE TOMATO GENOME CONSORTIUM, 2012) utilizando o programa hisat2 (KIM; LANGMEAD; SALZBERG, 2015). Após a etapa de alinhamento dos *reads*, o programa featureCounts (LIAO; SMYTH; SHI, 2014) foi utilizado para obtenção dos valores de *read counts*, que representam o número de *reads* que foram mapeados em um gene. *Reads* que apresentaram mais de uma opção de melhor alinhamento não foram considerados nas análises.

Genes diferencialmente expressos foram identificados utilizando-se um modelo generalizado linear (glm, *generalized linear model*) implementado no pacote edgeR do ambiente estatístico R (<http://www.r-project.org/>). Um design do tipo *one-way* foi utilizado para contrastar a resposta à infecção de cada um dos dois genótipos em cada ponto do tempo avaliado no estudo. O método de Benjamin & Hochberg foi aplicado para a correção dos *p-values* após a execução de múltiplos testes (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995). Genes apresentando FDR (*False Discovery Rate*) igual ou inferior a 0,01 (1%) e *fold-change* igual ou superior a 2 foram considerados diferencialmente expressos.

3.12 Avaliações de sintomas e incidência em mutantes com alterações nos programas de meristema inoculados com *M. perniciosa* biótipo-S

Os mutantes, *fasciated*, *Lanceolate*, *Mouse ears* e *ovate* (Tabela 2), e o MT foram utilizados para avaliar o número de lóculos nos frutos. As condições em que o experimento foi realizado, o preparo do material vegetal e inoculação foram idênticas a descritas no item 3.5. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (cinco parcelas com seis plantas, $n=30$). Aos 35 DAI, foi analisada a incidência da doença e o número de lóculos/fruto. Os dados de incidência foram transformados para $\sqrt{x+1}$ e foi submetido à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey), utilizando o pacote estatístico SAS - *Statistical Analysis System* (SAS INSTITUTE, 1996).

3.13 Clonagem do gene *IPT3* (*Isopentenyl transferase*)

Iniciadores para a amplificação do gene *IPT3* foram desenhados a partir da sequência de cDNA de tomateiro (Solyc01g080150.2.1). A amplificação de *IPT3* [ATGAATATTGTGTTACAACATATTGCA; CTAGTGCATAGTAGCAACTTTG] foi

realizada utilizando cDNA de tomateiro 6 h após inoculação com *M. perniciosa*, diluído a 10^{-1} ; 1,5 mM $MgCl_2$; 0,2 mM de dNTP; 1 U de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas); tampão de *Taq* DNA Polimerase; 0,2 μ M de cada iniciador e água ultrapura (Mili-Q) estéril, em volume final de 25 μ L e foram conduzidas em termociclador modelo Veriti Dx (Applied Biosystems). As etapas de amplificação consistiram de desnaturação inicial a 95 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 30 s, 50 °C por 30 s e 72° C por 90 s; com extensão final a 72 °C por 5 min. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de 1% agarose em tampão 1X SB. Após a confirmação do produto de amplificação, foi realizada uma reação utilizando *Taq* DNA Polimerase *High Fidelity* (Kapa Biosystems) e o produto de amplificação foi purificado utilizando o kit *Gel Band Purification* (Amersham Biosciences), e posteriormente, clonados no vetor de entrada pCR8/GW/TOPO TA (Invitrogen) do sistema *Gateway*. Para confirmação da presença do inserto foram realizadas digestões duplas com as enzimas de restrição *XhoI* e *XbaI*. A reação consistiu de 1 μ g de DNA plasmidial, 1 U de cada enzima, 1X tampão adequado, 50 ng μ L⁻¹ albumina soro bovino (BSA) e água ultrapura (Mili-Q) estéril, em volume final de 20 μ L e foram conduzidas em banho-maria a 37 °C por 1 h. A reação de digestão foi analisada por eletroforese em gel de 1% agarose em tampão 1X SB. Após a confirmação foi realizada a reação de recombinação para o plasmídeo binário pK7WG2D (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002) sob o controle do promotor 35S. A reação de recombinação do inserto continha 23 ng do vetor de entrada *pCR8::IPT3*, 169 ng do vetor de destino pK7WG2D e 2 μ L de *Gateway LR Clonase II Plus mix*. A reação foi incubada a 25 °C por 16 h. Após esse período, foi adicionado 1 μ L de solução de proteinase K (2 μ g μ L⁻¹) e incubado por 10 min a 37 °C.

3.14 Transformação de MT com o gene *IPT3* (*Isopentenyl transferase*)

Após a clonagem do gene *IPT3* de tomateiro sob controle do promotor 35S (*pK7WG2D::IPT3*) em *Agrobacterium* GV3101, foram transformados explantes de MT com os procedimentos descritos por Pino et al. (2010), em três experimentos independentes. Dessa forma, as colônias de *Agrobacterium* contendo a construção gênica foram crescidas por dois dias em placas, e foram usadas para inocular 50 mL do meio LB suplementado com espectinomicina (100 mg L⁻¹) e rifampicina (100 mg L⁻¹), e crescidas sob agitação constante de 120 rpm a 28 °C *overnight*. Após esse período, a suspensão foi colocada num tubo estéril e sedimentada a 1.900 rpm a 20 °C por 15 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e a

cultura de *Agrobacterium* ressuspensa em meio MS líquido, suplementado com sacarose (30 g L^{-1}) e a $OD_{600\text{nm}}$ foi ajustada para 0,3; 10 min antes do co-cultivo, $100 \mu\text{M}$ de acetosiringona foi adicionado à suspensão de *Agrobacterium*.

Explantes cotiledonares foram retirados de plântulas com 8 dias de idade e colocados em placas de Petri contendo meio MS suplementado com vitaminas B5; sacarose (30 g L^{-1}); $0,4 \mu\text{M}$ de ANA; $100 \mu\text{M}$ de acetosiringona. Uma gota da suspensão bacteriana foi colocada sobre os explantes. Após 10 min, a suspensão foi removida, e para a retirada do excesso de *Agrobacterium*, duas folhas de papel filtro estéril foram colocadas sobre os explantes. O co-cultivo foi conduzido em meio MS sólido suplementado com vitaminas B5, sacarose (30 g L^{-1}), $0,4 \mu\text{M}$ de ANA, $100 \mu\text{M}$ de acetosiringona por 2 dias no escuro a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Após esse período, os explantes foram transferidos para meio MS suplementado com vitaminas B5, sacarose (30 g L^{-1}), $5 \mu\text{M}$ de BA e antibióticos (25 mg L^{-1} meropenem, para controle da *Agrobacterium* e 100 mg L^{-1} de kanamicina, para seleção das plantas) e foram mantidos em sala de luz sob fotoperíodo de 16 h a 25°C . A cada duas semanas, os explantes foram transferidos para meio de regeneração novo suplementado com antibióticos. Os brotos foram mantidos *in vitro* até a formação de raízes e posteriormente, foram aclimatizados. Foram obtidas as sementes das plantas produzidas *in vitro* aclimatizadas (T_0).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização de isolados de *Monilophthora perniciosa* biótipo-S

Com o objetivo de padronizar as condições de ensaio de inoculação, foram avaliados a agressividade de três isolados do biótipo-S, estimada pelos sintomas de infecção como engrossamento do caule, altura da planta, massa seca das partes das plantas e pela incidência da infecção. Plantas de MT foram inoculadas com basidiósporos obtidos tanto pelo sistema *pie dish* (GRIFFITH; HEDGER, 1993), como de vassouras de lobeira coletadas em Tiradentes, MG (DEGANELLO et al., 2014).

Os sintomas da infecção, como engrossamento do caule e altura das plantas, foram avaliados aos 10, 20, 30 e 40 dias após a inoculação (DAI) (Figura 6), sendo que, a partir do trigésimo dia após a inoculação, os sintomas ficaram mais visíveis nas plantas inoculadas com os três isolados. Baseado no engrossamento do caule, o isolado de Tiradentes foi o mais agressivo em todos os períodos avaliados (Figura 6), com as plantas de MT inoculadas apresentando a menor média de altura (7,22 cm) e a maior média de diâmetro médio do caule (0,98 cm) aos 40 DAI. O isolado ‘Tiradentes’ foi o único que apresentou diferença significativa para incidência da doença em relação aos demais isolados, uma vez que 95 % das plantas inoculadas com o isolado ‘Tiradentes’ apresentaram sintomas (Figura 7). Não foi observada diferença significativa entre a incidência causada por inoculação com APS1 e WMA5 (Figura 7). Contudo, o isolado WMA5 induziu sintomas mais expressivos nas plantas de MT inoculadas quando comparado ao APS1 (Figura 6), com médias de 0,86 cm para o diâmetro do caule e 7,93 cm de altura, enquanto que em plantas inoculadas com APS1 apresentaram 0,63 cm para a média do diâmetro do caule e 7,85 cm de altura aos 40 DAI (Figura 6). As plantas controles apresentaram maior média de altura e menor média de diâmetro do caule, com valores aos 40 DAI de 9,22 cm e 0,57 cm, respectivamente (Figura 6).

Os principais sintomas da infecção por *M. perniciosa* em tomateiro MT são o engrossamento do caule e pecíolo e perda de dominância apical com redução da altura das plantas (DEGANELLO et al., 2014). As plantas inoculadas apresentaram menor altura que as controle não inoculadas, enquanto que o diâmetro do caule aumentou (Figura 6) corroborando com os resultados obtidos por Deganello et al. (2014). Vale ressaltar que, devido ao desenvolvimento das plantas serem sob iluminação artificial na câmara de crescimento, há

diferenças perceptíveis na arquitetura e aspecto das folhas (controles e inoculadas), como o encarquilhamento suave e maior espessura das folhas, possivelmente devido a diferenças na qualidade da luz oferecida.

Figura 6 – Altura da planta e diâmetro do caule de plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas com os isolados APS1, WMA5 ou Tiradentes do biótipo-S de *Moniliophthora perniciosa* aos 10, 20, 30 e 40 dias após a inoculação. Foram avaliadas seis parcelas, com 11 plantas em cada parcela ($n=66$)

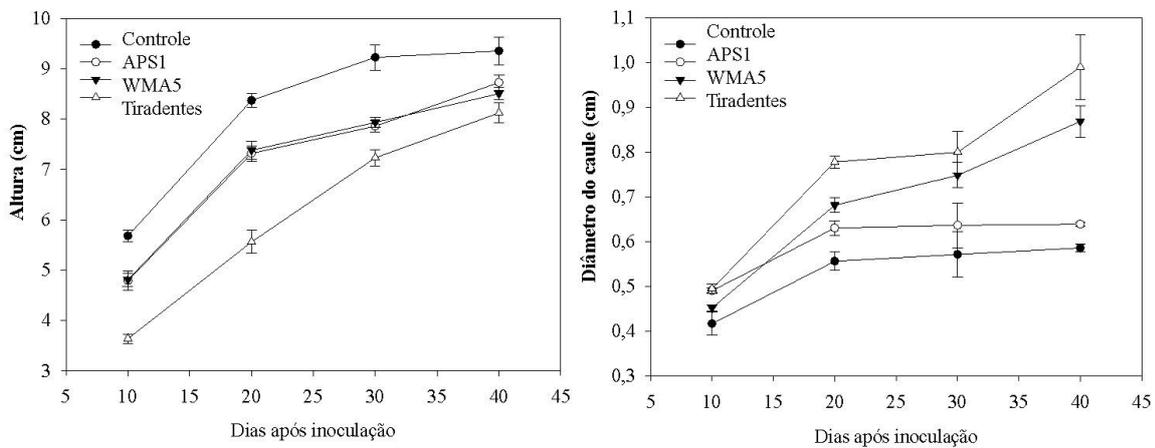
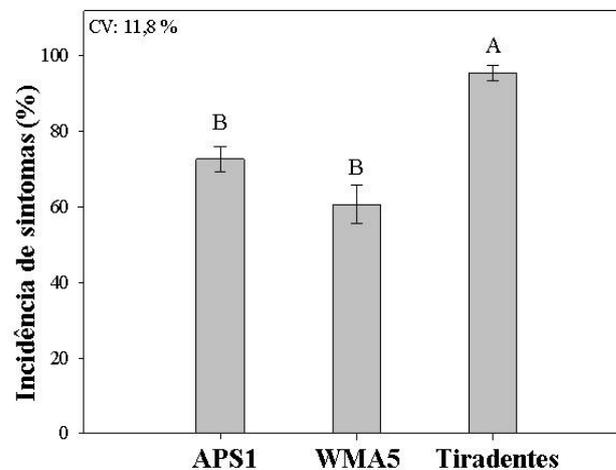


Figura 7 – Incidência de sintomas de infecção (%) em plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas com os isolados APS1, WMA5 ou Tiradentes do biótipo-S de *Moniliophthora perniciosa*. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Foram avaliadas seis parcelas, com 11 plantas em cada parcela ($n=66$)



Com o objetivo de investigar se a infecção poderia causar outras alterações no hospedeiro, foram avaliadas as massas seca da raiz e da parte aérea. A avaliação de massa seca da parte aérea das plantas de MT inoculadas com os três isolados permitiu observar que, apesar da altura média de plantas MT inoculadas com APS1, WMA5 e Tiradentes ser menor que a altura das plantas controle (Figura 6), não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a massa seca da parte aérea de plantas inoculadas com os três isolados quando comparadas com o controle (Figura 8). Por outro lado, foi possível observar que a infecção pelos isolados do biótipo-S no ápice caulinar diminuiu significativamente o desenvolvimento do sistema radicular de MT (Figuras 8 e 9). WMA5 e Tiradentes causaram uma redução significativa ($p < 0,05$) na massa seca radicular do hospedeiro em relação ao controle. A média da massa seca da raiz por planta foi de 0,42 g para WMA5, 0,55 g para Tiradentes, 0,68 g para APS1 e 1,30 g para o controle. Dello Loio et al. (2008) mostraram que a interação no padrão de sinalização dos hormônios citocinina e auxina necessária para o balanço entre divisão ou diferenciação celular, controlam o tamanho do meristema radicular e a taxa de crescimento da raiz. Corroborando com essa afirmação, Bielach et al. (2012) reportaram que esses hormônios atuam de forma antagônica durante a organogênese de raízes laterais e que, qualquer deficiência nesse *crosstalk* resulta num padrão de crescimento deficiente de raízes laterais. Sendo assim, a infecção pelo *M. perniciosus* poderia estar induzindo uma alteração no padrão de sinalização por citocinina e auxina, resultando na redução do crescimento do sistema radicular.

O sistema radicular possui um papel essencial no desenvolvimento das plantas, uma vez que é responsável pela absorção de água e nutrientes, além de sua função como suporte e interface com fatores bióticos e abióticos no solo (DE SMET et al., 2012). A diminuição da raiz decorrente da infecção por *M. perniciosus* pode causar um impacto na parte aérea das plantas, sendo esse estudo de grande relevância. Se demonstrado em cacaueteiro, o efeito na parte radicular poderia representar um avanço no conhecimento sobre a infecção e os impactos na produtividade e sustentabilidade nessa cultura.

Figura 8 – Massa seca da raiz e da parte aérea em plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas com os isolados APS1, WMA5 e Tiradentes do biótipo-S de *Monilophthora perniciosa*. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Foram avaliadas seis parcelas, com cinco plantas em cada parcela ($n=30$)

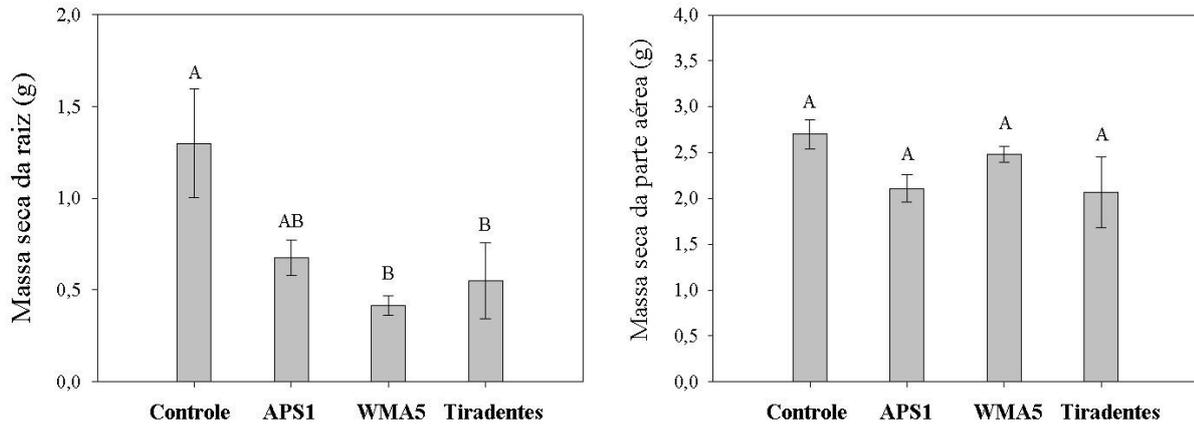


Figura 9 – Visualização da parte aérea e o sistema radicular plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas com os isolados APS1, WMA5 e Tiradentes do biótipo-S de *Monilophthora perniciosa*



Observações realizadas em microscopia de luz e eletrônica de varredura indicaram que os isolados WMA5 e Tiradentes provocaram o crescimento desordenado das células do córtex caulinar e hiperplasia nos tecidos do caule (córtex, floema e xilema) de tomateiro cv. MT aos 40 DAI (Figura 10). No controle, as células da epiderme de tecidos não infectados apresentaram-se uniformes com paredes pouco espessas (Figura 10A) e, no córtex, as células apresentaram-se maiores com paredes mais espessas e de forma organizada. Foi possível visualizar a colonização pelo patógeno no espaço intercelular no caule de MT inoculados com basidiósporos do isolado WMA5 aos 40 DAI, apesar de ser visualizado a colonização foi muito baixa (Figura 10D e E). Em caules de plantas inoculadas com o isolado APS1 e Tiradentes, não foi possível detectar a presença de micélio do patógeno (Figura 10B e F). Em cacauero suscetível, a hifa primária foi visualizada em baixas densidades no córtex 2 DAI (SENA et al., 2014). Deganello et al. (2014) e Marelli et al. (2009) também reportaram a colonização intercelular do micélio nos tecidos do caule de tomateiro apenas aos 30 DAI, que coincide com o período de observação de sintomas. Em cacauero, Silva (1997), Ceita et al. (2007) e Sena et al. (2014) reportaram o crescimento do micélio em baixas densidades e crescendo bastante lentamente no apoplasto na fase biotrófica do ciclo de vida do biótipo-C.

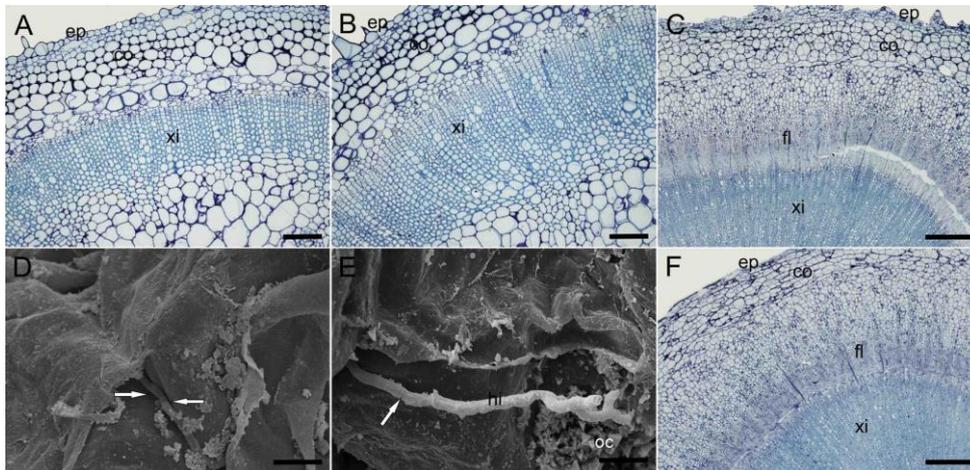
Cristais de oxalato de cálcio próximo a hifa de *M. perniciosa* foram observados no espaço intercelular (Figura 10E). Esse efeito também foi verificado em outros trabalhos na interação biótipo-S x tomateiro (MARELLI et al., 2009) e no patossistema biótipo-C x cacauero (CEITA et al., 2007; RIO et al., 2008; DIAS et al., 2011). A produção desses cristais pelo *M. perniciosa* pode estar associada aos mecanismos de patogenicidade na vassoura-de-bruxa (RIO et al., 2008).

Cortes histológicos de caules de plantas inoculadas permitiram observar uma desorganização nas células e um aumento na área do córtex, floema e xilema dos tecidos inoculados com WMA5 e Tiradentes (Figura 10C, F) em relação ao controle (Figura 10A), aparentemente pelo aumento no número de células, sendo que, o número e o volume das células não foram quantificados. Corroborando com esses resultados, Marelli et al. (2009) também reportaram que o engrossamento do caule corresponde ao aumento no volume e número de células do xilema e floema.

Não obstante ao crescimento do micélio de *M. perniciosa* em baixas densidades no apoplasto das plantas infectadas por WMA5, os efeitos na desorganização e aumento nas divisões celulares dos tecidos do caule, como córtex, xilema e floema são bastante

expressivos. Isso indica um possível envolvimento de hormônios vegetais, moléculas que atuam em pequenas concentrações na região de síntese ou a longas distâncias, influenciando o desenvolvimento vegetal (SANTNER et al., 2009).

Figura 10 – Microscopia de luz e eletrônica de varredura no caule do tomateiro cv. Micro-Tom aos 40 dias após inoculação com isolados do biótipo-S. **A:** controle; **B:** ‘Micro-Tom’ inoculado com APS1; **C, D e E:** ‘Micro-Tom’ inoculado com WMA5; **F:** ‘Micro-Tom’ inoculado com Tiradentes. ep= epiderme; co= córtex; fl= floema; xi= xilema; oc= oxalato de cálcio. Barras: A, B, C, e F= 300 µm; D e E= 10 µm



Durante as avaliações de incidência e dos sintomas da infecção nos tomates inoculados com os três isolados foi possível observar a ocorrência de variações na forma do fruto, com aumento no número de lóculos. Por isso, os números de lóculos foram estimados em frutos de plantas controles e inoculadas para investigar se o *M. perniciosa* poderia estar envolvido na distribuição irregular do número de lóculos e se existe de fato variação em relação à infecção por cada isolado.

O fruto carnoso de tomateiro possui lóculos, cavidades derivadas de carpelos que contêm sementes. O número de lóculos nos frutos em genótipos de tomateiro domesticado pode variar de dois até dez (MUÑOS et al., 2011). Espécies selvagens de tomate (*Solanum*) produzem apenas frutos biloculares (CONG et al., 2008). Durante a domesticação, o número de lóculos aumentou juntamente com o peso dos frutos. Dessa forma, o número de lóculos afeta a forma e o tamanho do fruto, sendo controlado pelo menos pelos genes *Locule Number (LC)* e *FASCIATED (FAS)* (MUÑOS et al., 2011).

O locus *lc* está localizado numa região não-codificante, localizada 1.080 pb *downstream* de *WUSCHEL (WUS)*, que codifica um fator de transcrição essencial para a

manutenção da identidade de *stem cell* no meristema apical SAM (*Shoot Apical Meristem*) atuando na manutenção do balanço entre proliferação e diferenciação de *stem cells* (MUÑOS et al., 2011). Em tomateiro, o alelo *lc* é associado com dois SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) *downstream* de *WUS* (MUÑOS et al., 2011). Li et al. (2017) mostraram que mutantes para o alelo *lc* apresentam maior expressão de *WUS*, o que sugere que a mutação *lc* causa maior expressão de *WUS*, conseqüentemente, ocorrerá maior manutenção de *stem cells* que leva ao aumento do número de lóculos. Proteínas CLAVATA (*CLV*) também atuam na regulação do padrão de sinalização por *WUS* (XU et al., 2015). Mutação em *CLV3* leva a formação de meristemas maiores, o qual pode levar ao desenvolvimento de órgãos extras em flores e frutos de tomateiro (XU et al., 2015).

Já o gene *FAS* (membro da família de fatores de transcrição do tipo *YABBY*) foi mapeado no cromossomo 11 do genoma do tomateiro e a sua mutação resulta numa inversão de 294 kb com um dos *breakpoints* no primeiro intron de *YABBY2* formando uma mutação nula e está a 1 kb *upstream* do gene *CLV3* (HUANG; VAN DER KNAAP, 2011; VAN DER KNAAP et al., 2014). O fenótipo do mutante é resultante da falta de expressão de *CLV3* e de aumento na expressão de *WUS* (MUÑOS et al., 2011). Van der Knaap et al. (2014) reportaram que há interação epistática positiva entre *LC* e *FAS* sugerindo que esses genes participam de uma única rede que controla o tamanho do meristema floral.

De maneira geral, plantas de tomateiro cv. MT inoculadas com os três isolados do biótipo-S apresentaram um aumento significativo no número de lóculos (Figuras 11 e 12), modificando a forma dos frutos (Figura 13). Também foi constatado que houve uma variação no número de lóculos e forma dos frutos de acordo com a agressividade do isolado inoculado. MT não inoculado apresentou a média de 3 lóculos fruto⁻¹, enquanto que frutos de plantas inoculadas com o isolado Tiradentes apresentaram maior número médio de lóculos (4,7 lóculos fruto⁻¹), diferindo significativamente dos isolados APS1 (4,2 lóculos fruto⁻¹) e WMA5 (3,9 lóculos fruto⁻¹) (Figura 11). A média do número de lóculos não diferiu significativamente entre frutos oriundos de plantas inoculadas com APS1 e WMA5.

A distribuição entre classes de número de lóculos fruto⁻¹ (2 a 10 lóculos fruto⁻¹) apresentada em percentual de frutos foi analisada para cada isolado, considerando o total de 110 frutos por tratamento. Deste modo, foi possível observar que frutos oriundos de plantas inoculadas com o isolado Tiradentes apresentaram maior variação no número de frutos com número de lóculos distintos, variando de 2 a 10 lóculos (Figura 12). Aproximadamente 75 % dos frutos analisados no controle possuem três lóculos; no entanto, foi observada uma variação de 2 a 5 lóculos fruto⁻¹ (Figura 113). Nos frutos analisados de plantas inoculadas

com os isolados APS1 e WMA5, a variação no número de lóculos dos frutos foi de 3 a 9 e 2 a 8, respectivamente (Figura 12). Sendo assim, é possível sugerir que o patógeno afeta o número de lóculos em frutos de tomateiro cv. MT, aumento o número de lóculos por fruto, e que parece haver relação entre a agressividade do isolado e o aumento e variação no número de lóculos em frutos de tomateiro MT. Esse sintoma induzido pela infecção pode ser consequência da manipulação do balanço hormonal no hospedeiro, que por sua vez, afetará o padrão de sinalização hormonal no meristema floral e as vias genéticas que controlam o desenvolvimento do carpelo e número de lóculos. A forma dessa sinalização permanece a ser estabelecida, mas pode estar associada a citocinina.

Foi possível sugerir que o isolado Tiradentes apresentou maior agressividade dentre os isolados avaliados, comportando-se diferencialmente com maior incidência, maior engrossamento do caule, redução da altura das plantas, maior distribuição da quantidade de lóculos nos frutos e redução na biomassa radicular. O desenvolvimento desses sintomas pela infecção do *M. perniciosa* pode ser resultado da alteração no padrão de metabolismo/sinalização hormonal no tomateiro, especificamente no balanço citocinina/auxina. Além disso, foi demonstrado que o sistema artificial de produção de basidiósporos produziu esporos viáveis e capazes de provocar sintomas observados pela redução do crescimento, aumento no diâmetro do caule, redução do sistema radicular e aumento no número de lóculos dos frutos.

Figura 11 – Média do número de lóculos nos frutos de plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas com os isolados APS1, WMA5 e Tiradentes do biótipo-S de *Moniliophthora perniciosa* e controle. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Foram avaliadas 11 parcelas com dez frutos em cada parcela ($n=110$)

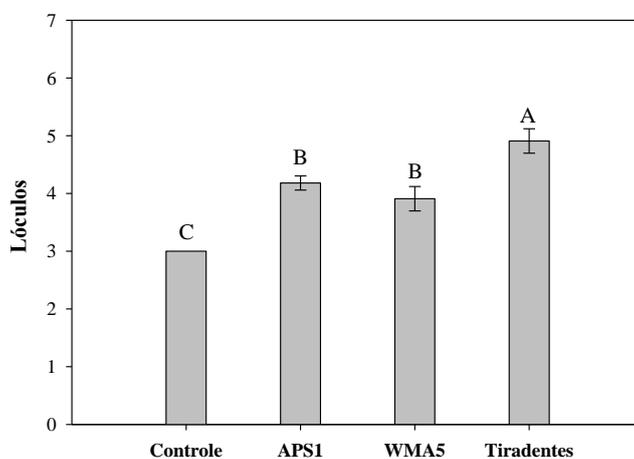


Figura 12 – Número de lóculos nos frutos de plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas com os isolados APS1, WMA5 e Tiradentes do biótipo-S *Monilophthora perniciosa* e controle. Número de lóculos (%) corresponde a quantidade de lóculos observada em relação ao total de frutos analisados por tratamento. Foram avaliados 440 frutos, sendo 110 frutos de cada tratamento

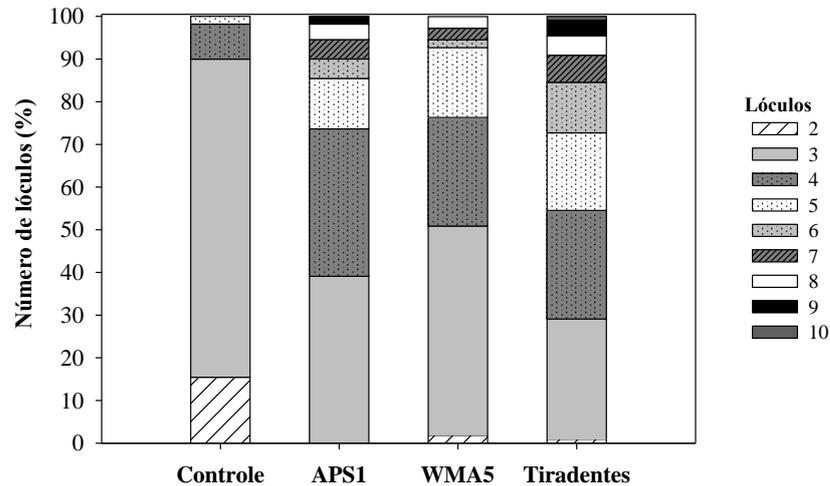
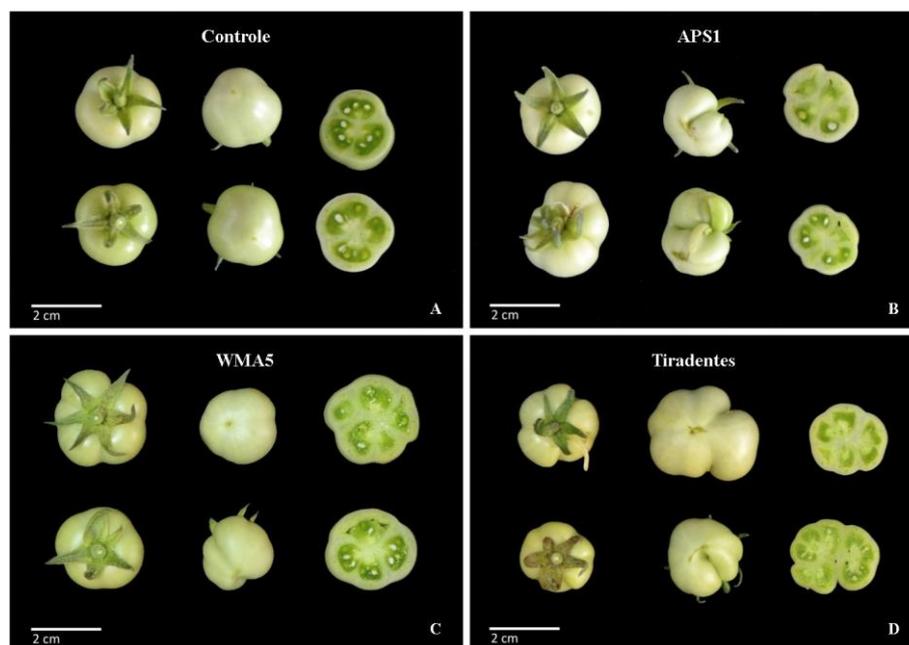


Figura 13 – Frutos de tomateiro cv. ‘Micro-Tom’ inoculados com três isolados (APS1 - B, WMA5 - C e Tiradentes - D) do biótipo-S *Monilophthora perniciosa*, visualizando a variação no número de lóculos após inoculação com basidiósporos obtidos de três isolados distintos

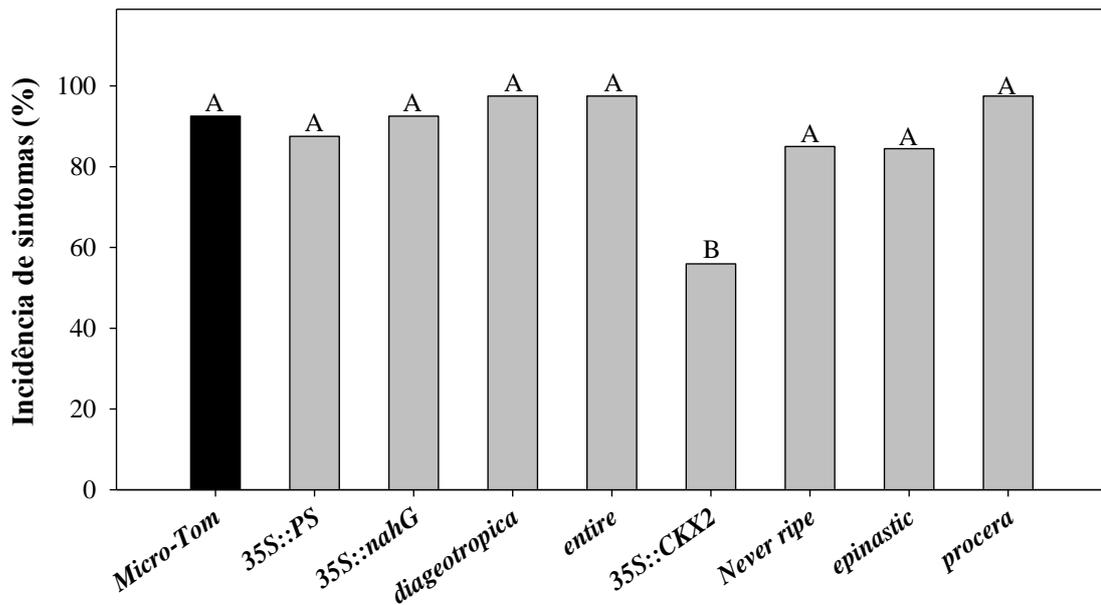


4.2 Resposta de mutantes e transgênicos hormonais à infecção pelo *M. perniciosa* biótipo-S

Os sintomas mais característicos da infecção causada pelo fungo *M. perniciosa* em tomateiro cv. MT são o aumento no diâmetro do caule e pecíolo e a redução da altura das plantas (DEGANELLO et al., 2014). Esses e outros sintomas, como formação de vassouras laterais em cacauero e superbrotamento em tomateiro, sugerem que hormônios vegetais relacionados à atividade da região meristemática possam estar envolvidos no desenvolvimento da patogênese. Nesse sentido, foi realizada a inoculação de cinco genótipos mutantes para percepção/síntese de hormônios (*diageotropica*, *entire*, *epinastic*, *Never ripe* e *procera*) e três linhas transgênicas (*35S::PS*, *35S::nahG* e *35S::AtCKX2*) (Tabela 1) para avaliar os genótipos que apresentam diferencial de incidência e/ou expressão de sintomas quando comparado com o MT de forma a identificar os potenciais hormônios vegetais associados a patogênese em tomateiro. O *screening* foi repetido duas vezes de forma independente, sendo que na primeira vez foram avaliadas cinco repetições com três plantas por parcela e, no segundo experimento foram avaliadas quatro repetições com dez plantas em cada repetição. Os resultados apresentados abaixo derivam do segundo experimento.

Dentre todos os mutantes e linhas transgênicas analisadas, somente o transgênico *35S::AtCKX2*, que superexpressa uma citocinina oxidase e supostamente apresenta níveis reduzidos de citocininas, apresentou redução no número de plantas com sintomas (55,95 % de plantas com sintomas), diferindo significativamente para a incidência de infecção (percentual de plantas com sintomas) em relação ao MT, que apresentou 92,5 % das plantas com sintomas, e dos demais genótipos avaliados. Os outros genótipos avaliados demonstraram incidência similar ao controle suscetível MT, sem diferenças significativas (Figura 14).

Figura 14 – Incidência de sintomas de infecção (%) nos mutantes (*diageotropica*, *entire*, *Never ripe*, *epinastic* e *procera*) e linhas transgênicas (*35S::PS*, *35S::nahG*, *35S::AtCKX2*) hormonais introgrididos em ‘Micro-Tom’ inoculados com *Moniliophthora perniciosa* do biótipo-S. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Foram avaliadas quatro parcelas, com 10 plantas em cada parcela ($n=40$)



De modo geral, as plantas inoculadas de todos os genótipos testados apresentaram altura inferior em relação às plantas não inoculadas (Figura 15). Apenas o transgênico *35S::PS* não apresentou diferença na altura média entre as plantas controles e inoculadas (Figura 15), enquanto que nos demais genótipos houve uma tendência de redução da altura das plantas inoculadas. Contudo, como o principal sintoma observado no tomateiro, o diâmetro do caule foi maior nas plantas inoculadas do que no controle, sendo mais evidente a partir do 25° dia após inoculação (Figura 16).

Figura 15 – Altura média das plantas (cm) dos mutantes (*diageotropica*, *entire*, *Never ripe*, *epinastic* e *procera*) e linhas transgênicas (35S::PS, 35S::nahG, 35S::AtCKX2) hormonais introgrididos em ‘Micro-Tom’ inoculados com *Moniliophthora perniciosa* do biótipo-S aos 5, 15, 25 e 35 dias após inoculação. A média foi calculada com base apenas nas plantas que apresentaram sintomas da doença

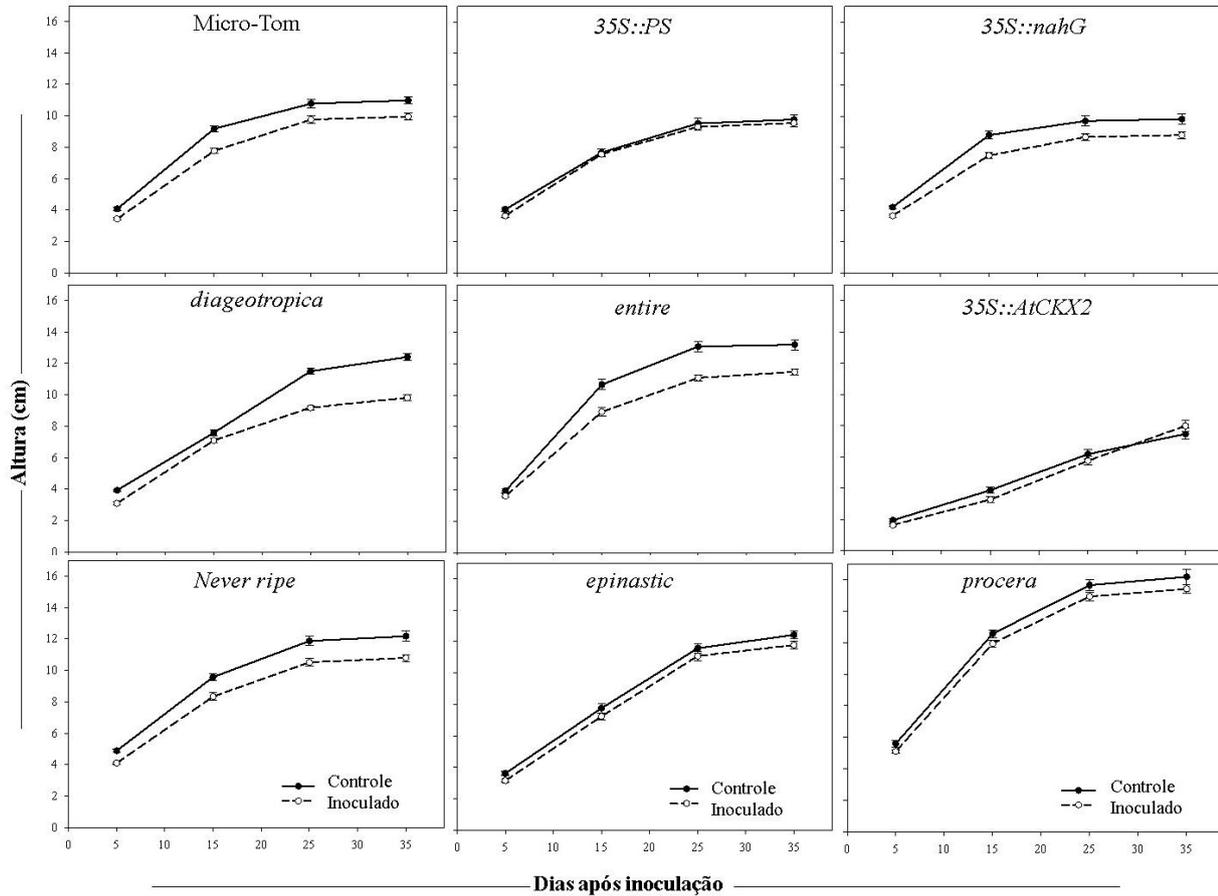
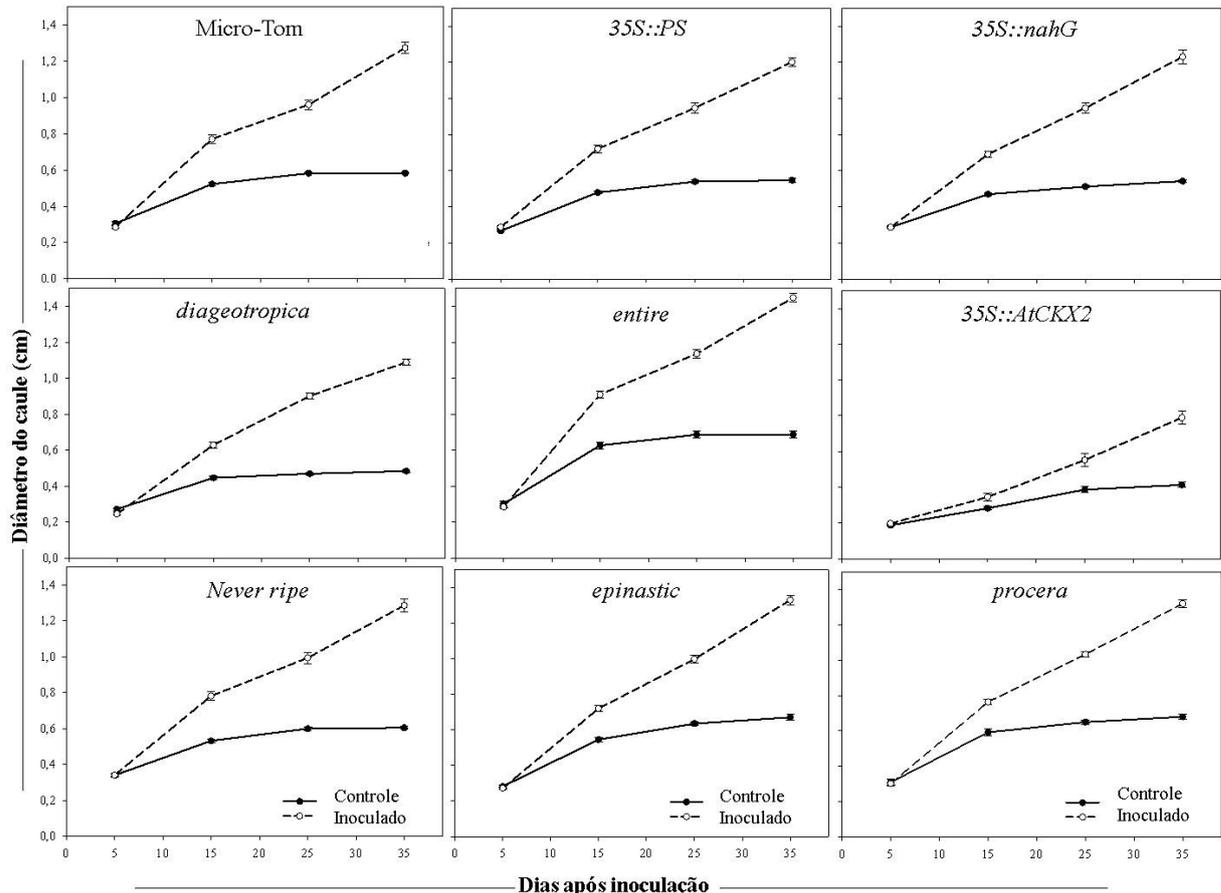


Figura 16 – Diâmetro médio do caule (cm) nos mutantes (*diageotropica*, *entire*, *Never ripe*, *epinastic* e *procera*) e linhas transgênicas (35S::PS, 35S::nahG, 35S::AtCKX2) hormonais introgrididos em ‘Micro-Tom’ inoculados com *Moniliophthora perniciosa* do biótipo-S aos 5, 15, 25 e 35 dias após inoculação. A média foi calculada com base apenas nas plantas que apresentaram sintomas da doença



Na avaliação do diâmetro do caule, todos os genótipos inoculados diferiram significativamente do seu respectivo controle não inoculado aos 35 DAI (Figura 17). Ao comparar todos os genótipos inoculados, o transgênico 35S::AtCKX2 apresentou a menor média de diâmetro do caule (Figura 17), diferindo dos demais genótipos. Os genótipos com respostas contrastantes para a percepção à auxina, *entire* e *diageotropica*, diferiram significativamente do controle suscetível MT. O mutante *entire* apresentou a maior média de diâmetro do caule, enquanto que o mutante *diageotropica* apresentou média menor que o MT e *entire* (Figura 17). Os demais genótipos avaliados não diferiram significativamente do MT. O engrossamento do caule e do pecíolo, sintomas típicos da infecção no tomateiro foram observados em todos os genótipos avaliados (Figura 18).

Figura 17 – Diâmetro médio do caule (cm) nos mutantes (*diageotropica*, *entire*, *Never ripe*, *epinastic* e *procera*) e linhas transgênicas (*35S::PS*, *35S::nahG* e *35S::AtCKX2*) hormonais introgrididos em ‘Micro-Tom’ inoculados com *Moniliophthora perniciosa* do biótipo-S aos 35 dias após inoculação. Colunas seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). i) Letras maiúsculas – comparação entre genótipos na mesma condição (inoculado ou controle); ii) Letras minúsculas – comparação de cada genótipo inoculado em relação ao controle. Foram avaliadas quatro parcelas de plantas controles, com 5 plantas em cada parcela ($n=20$) e quatro parcelas de plantas inoculadas: Micro-Tom, *diageotropica*, *entire* e *procera*, $n= 39$; *35S::PS*, $n= 35$; *35S::nahG*, $n= 37$; *35S::AtCKX2*, $n= 24$; *Never ripe* e *epinastic*, $n= 34$

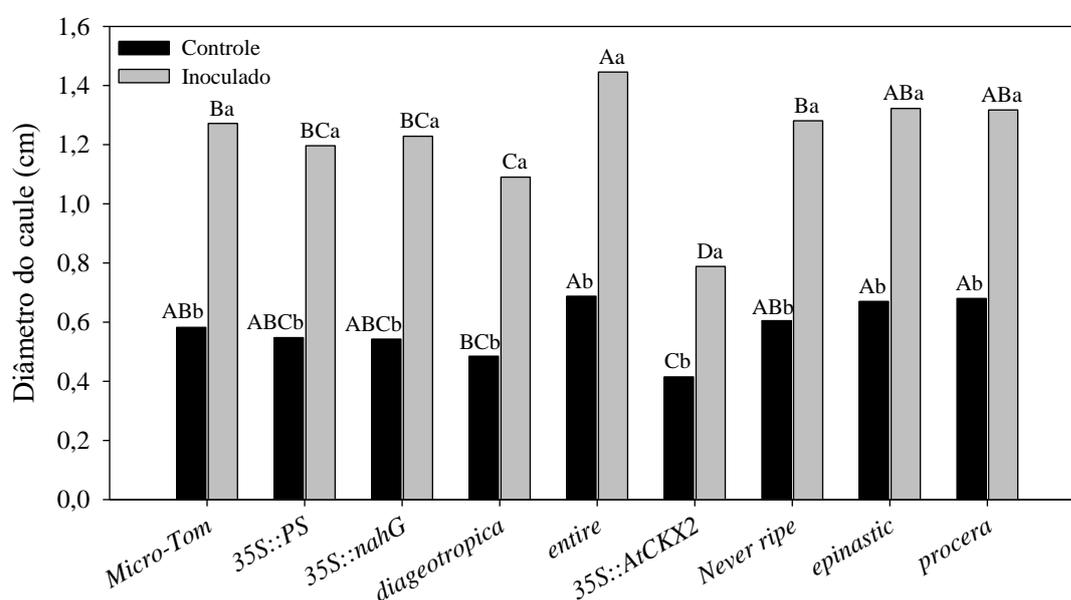


Figura 18 – Sintomas da doença (engrossamento do caule e pecíolo) no tomateiro ‘Micro-Tom’, nos mutantes (*diageotropica*, *entire*, *Never ripe*, *epinastic* e *procera*) e linhas transgênicas (*35S::PS*, *35S::nahG* e *35S::AtCKX2*) hormonais introgrididos em ‘Micro-Tom’, inoculados ou não inoculados com *Monioliophthora pernicioso* do biótipo-S aos 35 dias após inoculação



Como observado anteriormente, inoculação com isolado do biótipo-S promove o aumento do número de lóculos nos frutos de MT. Desta maneira, foi investigado se os hormônios vegetais poderiam estar envolvidos nas diferenças morfológicas do fruto de tomateiro. Para isso, foi realizada a quantificação do número de lóculos dos frutos e a distribuição de frutos, em porcentagem, em diferentes classes de acordo com o número de

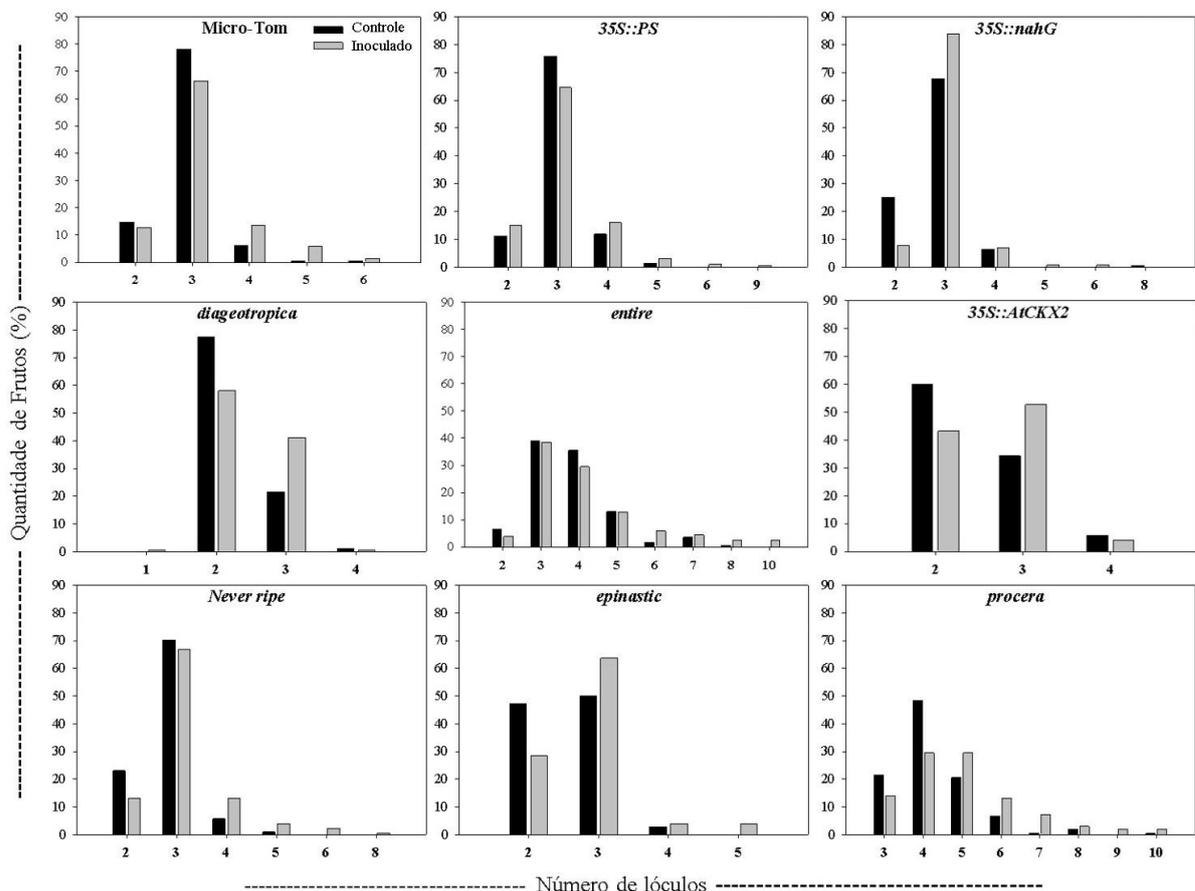
lóculos em cinco mutantes (*diageotropica*, *entire*, *epinastic*, *Never ripe* e *procera*) e três linhas transgênicas hormonais (*35S::PS*, *35S::nahG* e *35S::AtCKX2*) (Tabela 1) inoculados com o isolado Tiradentes, que apresentou maior agressividade dentre os isolados avaliados. Foram avaliados os frutos obtidos de 40 plantas para cada genótipo.

Segundo Barrero; Tanksley (2004), tomateiros selvagens produzem flores com cinco a seis sépalas, pétalas e estames, e dois a quatro carpelos, enquanto que genótipos domesticados produzem frutos multiloculares, e frequentemente, flores com aumento no número dos órgãos florais (sépalas, pétalas e estames). Os genótipos avaliados que mais apresentaram variação na distribuição de lóculos quando inoculados foram os mesmos que apresentaram maior variação no número de sépalas, variando de 3 a 13 sépalas nos mutantes *entire* e *procera*.

A avaliação do número de lóculos por frutos dos mutantes e transgênicos hormonais mostram a mesma tendência observada em MT, em que, a infecção pelo isolado Tiradentes tende a aumentar o número de lóculos nos frutos de tomateiro. Dessa forma, houve uma maior variação na distribuição da quantidade de lóculos nas plantas inoculadas quando comparadas com as controle (Figura 19). Os genótipos *35S::PS*, *35S::nahG*, *entire*, *epinastic*, *Never ripe* e *procera* apresentaram uma tendência a produzirem frutos com mais lóculos nas plantas inoculadas (Figura 19), sendo que os mutantes *entire* e *procera* apresentaram a maior amplitude de variação na distribuição da quantidade de lóculos, variando de 2 a 10 lóculos no *entire* e de 3 a 10 lóculos no *procera*. Pela distribuição do número de lóculos de frutos do genótipo *diageotropica*, com baixa sensibilidade à auxina também foi possível observar que não houve muita variação do tratamento inoculado em relação ao controle, com a amplitude de variação de número de lóculos nos frutos de plantas inoculadas de 1 a 4 lóculos e nas plantas controle de 2 a 4 (Figura 19).

Já no transgênico *35S::AtCKX2*, com baixos níveis de citocinina, as plantas controles e inoculadas apresentaram a mesma amplitude na distribuição de número de lóculos nos frutos, variando de 2 a 4 lóculos (Figura 19). Esse resultado sugere que, possivelmente o fungo induz um aumento nos níveis de citocinina, alterando o padrão de sinalização hormonal do meristema floral, o qual por sua vez, leva a formação de frutos com mais lóculos.

Figura 19 – Quantidade de lóculos nos frutos dos mutantes (*diageotropica*, *entire*, *epinastic*, *Never ripe* e *procera*) e três linhas transgênicas hormonais (*35S::PS*, *35S::nahG* e *35S::AtCKX2*) de tomateiro ‘Micro-Tom’ inoculado com *Moniliophthora perniciosa* biótipo-S e controle (não inoculado). Quantidade de frutos correspondem as observações em porcentagem da quantidade de lóculos observada em relação ao total de frutos analisados por tratamento. Micro-Tom controle e inoculado, $n= 225$ e 254 frutos, respectivamente; *35S::PS* controle e inoculado, $n= 153$ e 246 frutos, respectivamente; *35S::nahG* controle e inoculado, $n= 171$ e 169 frutos, respectivamente; *diageotropica* controle e inoculado, $n= 177$ e 237 frutos, respectivamente; *entire* controle e inoculado, $n= 169$ e 165 frutos, respectivamente; *35S::AtCKX2* controle e inoculado, $n= 105$ e 289 frutos, respectivamente; *Never ripe* controle e inoculado, $n= 104$ e 214 frutos, respectivamente; *epinastic* controle e inoculado, $n= 106$ e 104 frutos, respectivamente; e *procera* controle e inoculado, $n= 209$ e 226 frutos, respectivamente



O transgênico *35S::AtCKX2* foi o genótipo que apresentou a maior resposta diferencial à infecção pelo *M. perniciosa*, tanto pelo menor percentual de plantas com sintomas e menor média de diâmetro do caule (Figuras 14 e 17), quanto pela reduzida mudança no número de lóculos nos frutos das plantas inoculadas (Figura 19).

Esse transgênico apresenta expressão constitutiva do gene *CKX2* de *Arabidopsis thaliana*, uma oxidase de citocinina, que reduz os níveis endógenos de citocininas no transgênico (PINO et al., 2010). A resistência mediada por citocinina parece estar envolvida com mecanismos dependentes de ácido salicílico, em que reguladores positivos da sinalização de citocinina ARR2 interagem com o fator de transcrição TGA3, envolvido na indução de genes dependentes de ácido salicílico (AS) e na indução do gene marcador *PRI* contra infecções por agentes biotróficos em plantas (WU et al., 2012). Argueso et al. (2012) reportaram que altas concentrações de citocinina regula o sistema imune de *Arabidopsis* contra patógeno biotrófico *Hyaloperonospora arabidopsidis* isolado Noco2 num processo dependente de AS e da indução da expressão de genes de defesa.

Além desse papel, é bem conhecido que citocininas estão envolvidas na patogênese provocadas por patógenos que induzem formação de tumores em seus hospedeiros, como por exemplo: protistas – *Plasmodiophora brassicae* (SIEMENS et al., 2006), nematoides – *Heterodera schachtii* (SIDIQUE et al., 2015), bactérias – *Pseudomonas savastanoi*, *Agrobacterium* sp. (BARCISZEWSKI et al., 2000) e *Rodococcus fascians* (PERTRY et al., 2009); e fungos – *Ustilago maydis* (MILLS; VAN STADEN, 1978) e *Claviceps purpurea* (HINOSHI et al., 2015).

Em cacaueiro suscetível (IMC 67 x Catongo) infectado por *M. pernicioso*, os níveis de citocininas (*zeatin*, *zeatin riboside*, *isopentenyl adenine* e *isopentenyl adenosine*) foram quantificados por imunoensaios, mas apenas a *zeatin riboside* apresentou aumento significativo no inoculado quando comparado ao controle, ainda que em baixos níveis (ORCHARD et al., 1994). No presente estudo, a avaliação do transgênico *35S::AtCKX2*, quando inoculado, apresentou expressão reduzida dos sintomas da infecção, sugerindo que baixos níveis de citocinina favorecem a redução no engrossamento do caule e a redução no aumento do número de lóculos. Os sintomas da infecção pelo *M. pernicioso* no tomateiro parecem com os sintomas de doenças que induzem a formação de galhas ou tumores, os quais foram demonstrados que as citocininas estão envolvidas na patogênese provocada por patógenos que a induzem a formação desses sintomas (CHANCLUD; MOREL, 2016). Na interação com o tomateiro, sugere que o *M. pernicioso* induza uma alteração no padrão de sinalização por citocinina ou aumento nos níveis de citocininas, que por sua vez, irá alterar o diâmetro do caule, o crescimento da planta, o número de lóculos nos frutos e a biomassa radicular.

Os mutantes *diageotropica* e *entire* possuem alterações na percepção do hormônio auxina, e apresentaram as maiores incidências de plantas sintomáticas, cerca de 97,5%, não diferindo do MT (controle suscetível) (Figura 14). Apesar de *diageotropica*, que possui reduzida sensibilidade ao hormônio auxina, ter apresentado alta incidência, a média do diâmetro do caule foi significativamente menor que MT e *entire* (Figura 17). Por outro lado, a maior média de diâmetro do caule entre todos os genótipos avaliados foi observada no mutante *entire*, que possui alta sensibilidade à auxina (Figura 17).

A sinalização por auxina parece atuar na regulação do desenvolvimento floral para aumentar o número de lóculos, uma vez que, o mutante *entire* foi um dos genótipos que apresentou maior tendência a ter frutos com mais lóculos, enquanto que, no mutante *diageotropica* foi observado fenótipo oposto, apresentando quase o mesmo padrão de distribuição de número de lóculos nos frutos oriundos de plantas inoculadas e controles (Figura 19).

Alguns estudos demonstraram que o fungo *M. perniciosa* possui a capacidade de produzir e metabolizar o hormônio auxina (KILARU et al., 2007; ALVAREZ, 2013). No genoma de *M. perniciosa*, foram identificados genes relacionados à via biossintética da auxina ácido indol acético (IAA) (MONDEGO et al., 2008), sugerindo que esse hormônio poderia atuar sinergisticamente na interação, contribuindo para a patogenicidade e para o desenvolvimento dos sintomas da doença na interação *T. cacao* x *M. perniciosa*. Na interação do *M. perniciosa* com o tomateiro, o desenvolvimento dos sintomas como engrossamento do caule, aumento no número de lóculos, redução no crescimento e redução na biomassa radicular pode estar associado à alterações no balanço citocinina e auxina, sugerindo que esses hormônios podem atuar na patogenicidade do *M. perniciosa* biótipo-S.

Já o transgênico *35S::PS*, que apresenta a superprodução de prosistemina, um peptídeo sinalizador e regulador positivo da via de sinalização de ácido jasmônico (AJ), apresentou uma menor incidência de infecção (87,5 %; Figura 14), não diferindo do MT e sem alteração de altura das plantas infectadas (Figura 15). Contudo, mostrou aumento no diâmetro médio do caule de plantas infectadas (Figuras 16 e 17) e no número de lóculos dos frutos (Figura 19). KILARU et al. (2007) verificou que o incremento exógeno de AJ no meio de cultivo de micélios de *M. perniciosa* induziu o crescimento deste fungo. Mecanismos de resistência contra *M. perniciosa* em cacauero parecem ser mediados pela sinalização por AJ, pois há a indução preferencial de gene chave da rota de síntese de deste hormônio (*TcAOS*) em genótipos resistentes de cacauero (LITHOLDO JUNIOR et al., 2015).

O transgênico *35S::nahG* apresentou o mesmo percentual de incidência da doença que o MT (92,5 %; Figura 14) e, apesar da média do diâmetro do caule ser relativamente menor que MT, a mesma não diferiu significativamente do MT (Figura 17). *35S::nahG* apresenta níveis reduzidos de AS devido a degradação desse hormônio pela superexpressão da enzima salicilato hidroxilase (BRADING et al., 2000). AS é sugerido por contribuir na patogenicidade deste fungo, sendo que este hormônio foi detectado no micélio de *M. perniciosa* (KILARU et al., 2007). Embora o *M. perniciosa* produza AS, a superexpressão do gene salicilato hidroxilase no transgênico deveria reduzir o acúmulo desse hormônio na planta. No entanto, mesmo com níveis reduzidos de AS no transgênico *35S::nahG*, o *M. perniciosa* é capaz de infectar e desenvolver sintomas como, engrossamento do caule, redução no crescimento e aumento no número de lóculos, sugerindo que o AS possivelmente, não seja o principal hormônio vegetal associado a patogênese do *M. perniciosa* biótipo-S.

Foram também avaliados dois mutantes contrastantes para a percepção ao etileno: o mutante *Never ripe* que apresenta baixa sensibilidade ao etileno e o mutante *epinastic*, com elevados níveis de etileno. Os dois mutantes apresentaram incidência de infecção similar, com 84,4 e 85,0 % de plantas sintomáticas respectivamente, com menores níveis em relação ao MT, mas sem diferir significativamente (Figura 14). Como as incidências foram similares entre os mutantes de fenótipo opostos em relação a etileno (baixa sensibilidade ou alta produção), aparentemente a incidência de infecção não parece ser afetada por etileno. Porém, o mutante *epinastic* apresentou média superior de diâmetro do caule quando comparado ao MT e *Never ripe* (Figura 17), apesar de não diferir significativamente. Já o mutante *Never ripe* apresentou valores similares ao MT, não diferindo significativamente do MT (Figura 17).

Gene associado à biossíntese de etileno (*TcSAM*) aparece diferencialmente expresso entre genótipos de cacaueteiro contrastantes para resistência, e em vassouras verdes do cacaueteiro foi observada regulação positiva de vários genes que codificam fatores de transcrição em resposta ao etileno (TEIXEIRA et al., 2014; LITHOLDO JUNIOR et al., 2015). Sendo assim, apesar de Scarpari et al. (2005) reportarem que houve um aumento significativo no nível de etileno durante o desenvolvimento dos sintomas e com a progressão da doença no cacaueteiro, na interação *M. perniciosa* x tomateiro, aparentemente, o etileno não esteja associado ao desenvolvimento dos sintomas.

Assim como os mutantes associados a auxina, o mutante *procera* apresentou maior percentual de plantas infectadas, cerca de 97,5 % (Figura 14) e, como o *entire*, maior distribuição do número de lóculos nos frutos de plantas inoculadas (Figura 19). Este mutante

apresenta sinalização por giberelina de forma constitutiva, pois a mutação não permite a ação repressora da sinalização por giberelina da proteína DELLA, demonstrando um fenótipo com maior altura do que MT (Figura 15). A alta incidência da infecção não se correlaciona com maior média do diâmetro do caule, sendo sutilmente maior em *procera* quando comparado com o MT (Figura 17). Pouco se sabe sobre o papel de giberelinas na defesa a patógenos, no entanto, Navarro et al. (2008) sugerem que as proteínas DELLA promovem a suscetibilidade a patógenos biotróficos e resistência a necrotróficos em *Arabidopsis*, por meio da alteração do balanço da sinalização AS/AJ.

Com base nestes resultados, as classes de hormônios que foram demonstradas estar associadas à patogênese no tomateiro, avaliadas pelo engrossamento do caule, crescimento da parte aérea e distribuição do número de lóculos nos frutos são a citocinina e auxina, visto que a linha transgênica 35S::*AtCKX2* inoculada apresentou menor incidência da infecção, menor média de diâmetro do caule, e não apresentou redução no crescimento e aumento no número de lóculos. Por sua vez, os mutantes *diageotropica* e *entire* apresentaram diferenças contrastantes no engrossamento do caule e na distribuição do número de lóculos em relação ao MT.

Já os demais hormônios avaliados não mostraram efeitos contrastantes ou significativos para incidência da doença, engrossamento do caule e distribuição do número de lóculos quando comparados ao MT. No entanto, AJ, AS, etileno e giberelina poderiam estar atuando de maneira indireta, alterando o balanço citocinina/auxina e, de certa forma, contribuindo para o sucesso da colonização do *M. perniciosa*. Além disso, o papel desses hormônios na patogenicidade do *M. perniciosa* depende também do tipo de mutante/linha transgênica (com ganho ou perda de função gênica) e de sua ação na percepção ou síntese. Contudo, somente com base nestes resultados, não é possível sugerir o papel destes hormônios na patogenicidade.

4.3 Histologia e quantificação da área do caule de MT, *diageotropica*, *entire* e 35S::*AtCKX2* alterada em resposta à infecção pelo *M. perniciosa* biótipo-S

O engrossamento do caule é o principal sintoma visual da infecção por *M. perniciosa* no tomateiro, e o desenvolvimento deste sintoma parece estar associado aos efeitos de auxina e citocinina. Por isso, foram realizadas análises histológicas de seções transversais do caule de MT e dos mutantes *diageotropica* e *entire* e linha transgênica 35S::*AtCKX2* que apresentaram

resposta diferencial a inoculação por *M. pernicioso* quando comparados com o MT, além da quantificação visual da área de cada tecido que compõe o caule para determinar quais deles estão relacionadas com o engrossamento com o objetivo de buscar evidência sobre a classe hormonal que afeta esse engrossamento do caule.

Todos os genótipos controles (não inoculados) apresentaram médias similares de área total de cada tecido do caule, sem diferença significativa entre os genótipos (Figura 20). Apesar de não haver diferença significativa, *diageotropica* e *35S::AtCKX2* apresentaram menores médias de área de medula (Figura 20A), sendo que *35S::AtCKX2* também apresentou as menores médias de áreas de xilema e córtex (Figura 20B e D). Já o *entire* apresentou maiores médias de áreas do xilema e córtex (Figura 20B e D). Esses dados correlacionam com a média do diâmetro do caule, em que, *entire* apresentou maior média de diâmetro, seguido do MT e do *diageotropica* e, o *35S::AtCKX2* apresentou a menor média de diâmetro do caule. Dessa forma, os baixos níveis de citocinina no genótipo *35S::AtCKX2* resulta numa menor proliferação de células da medula, xilema e córtex, enquanto que, a alta sensibilidade à auxina no genótipo *entire* leva a uma maior proliferação das células do xilema e córtex.

De maneira geral, todos os genótipos inoculados avaliados tiveram um aumento expressivo nos tecidos vasculares e córtex (Figuras 21B, C, E, F, H, I, K e L; e 16 B-D), quando comparados aos controles não inoculados (Figuras 21A, D, G e J; 18 B-D), sugerindo que a infecção pelo fungo afeta o desenvolvimento destes tecidos. No MT inoculado (Figuras 21B-C e 20), o engrossamento do caule está principalmente associado ao aumento no número de células do tecido vascular (xilema e floema) e córtex, apresentando maiores áreas em cortes transversais destes tecidos do que nos mutantes e transgênicos (Figura 20B-D). Os cortes evidenciam que o patógeno induz hipertrofia (aumento no volume de células) e hiperplasia (aumento no número de células) destes tecidos. Apesar da área total da medula do MT inoculado diferir do controle e dos demais genótipos, esse aumento relativo é aproximadamente duas vezes menor que o aumento do xilema (Figura 20A).

Nos mutantes com alterações na percepção à auxina (*diageotropica* e *entire*), o aumento no diâmetro do caule infectado está associado ao aumento da área referente ao xilema, floema e córtex (Figuras 21E-F, H-I e 20). O mutante *diageotropica*, com baixa sensibilidade à auxina, quando inoculado, apresentou maior desorganização das células do córtex (Figura 21E-F), mas este mutante inoculado apresentou valores similares de áreas de xilema, floema e córtex (Figura 20B-D). Nas plantas inoculadas de *entire*, mutante com alta sensibilidade à auxina, foi observado, um sutil aumento na área do xilema e córtex e as células do floema se apresentaram em maior volume e quantidade (Figuras 21H-I e 20C)

quando comparado ao *diageotropica* inoculado, diferindo significativamente (Figura 21E-F e 20C). Comparando esses dois genótipos contrastantes para percepção à auxina inoculados, esses resultados sugerem que maior sinalização por auxina possivelmente resulta em um aumento na área do floema (Figura 20C).

Já nas plantas *35S::AtCKX2* com redução nos níveis de citocinina, quando inoculadas, os tecidos relacionados ao engrossamento do caule são xilema, floema e córtex, que apresentaram área significativamente maior em relação ao controle (não inoculado) (Figura 20). Conforme o esperado, esse genótipo apresentou menor percentual de plantas com sintomas, menor média de diâmetro do caule e menores áreas de xilema, floema e córtex, diferindo significativamente do MT e dos mutantes de percepção à auxina quando inoculados.

De modo geral, o engrossamento do caule em tecidos infectados por *M. perniciosa* está associado à hipertrofia das células e hiperplasia do tecido vascular (xilema e floema) e córtex. Vale ressaltar que, o número e volume das células não foram quantificados devido a espessura do corte (sobreposição de camadas de células). As inferências relacionadas à hiperplasia e hipertrofia das células foram feitas com base nas observações visuais dos cortes (Figura 21).

Sabe-se que os hormônios auxina e citocinina são essenciais na formação do tecido vascular (ALONI, 1995). Em níveis reduzidos de auxina, o floema pode ser formado, mesmo que não ocorra formação de xilema, que é o que acontece, por exemplo, com as algas (BEHNKE, 1975). Por outro lado, para haver formação e diferenciação do xilema, são necessários níveis mais altos de auxina (ALONI, 2004). Apenas na presença de citocinina não há indução do desenvolvimento do tecido vascular, mas em combinação com a auxina, a citocinina induz a proliferação celular do tecido vascular, por meio da manutenção da atividade procambial, além de promover a diferenciação do câmbio vascular em xilema e floema (HELARIUTTA; BHALERAO, 2003).

Sendo assim, comparando a anatomia do caule destes genótipos inoculados com os seus controles é evidente que houve aumento no córtex e, principalmente, no xilema e floema, o que sugere que o fungo estimula a sinalização ou induz um aumento nos níveis de citocinina e auxina que, por sua vez atuam na diferenciação e proliferação das células do tecido vascular, o que representa o engrossamento do caule relacionados aos maiores valores de área de xilema, seguidos de floema. Na linha transgênica *DR5::GUS* (promotor de resposta à auxina fusionado ao gene repórter), Marelli et al. (2009) mostraram que houve maior sinalização de resposta à auxina no inoculado do que no controle, representado pela maior zona de coloração no xilema primário que, por sua vez, correlaciona com a zona de

engrossamento do caule. No presente trabalho, não foi realizado cortes histológicos dos tecidos corados com GUS. Corroborando com os resultados obtidos em tomateiro cv. MT, vassouras verdes e necrosadas de cacauero apresentam aumento na área da medula, xilema e córtex (ORCHARD et al., 1994).

Figura 20 – Área dos tecidos do caule de ‘Micro-Tom’, mutantes e transgênico hormonal inoculados com *Moniliophthora perniciosa* aos 35 dias após inoculação. Colunas seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). i) Letras maiúsculas – comparação entre genótipos na mesma condição (inoculado ou controle); ii) Letras minúsculas – comparação de cada genótipo inoculado em relação ao controle. Foram avaliadas três repetições biológicas. **A:** medula, **B:** Xilema, **C:** Floema e **D:** Córtex

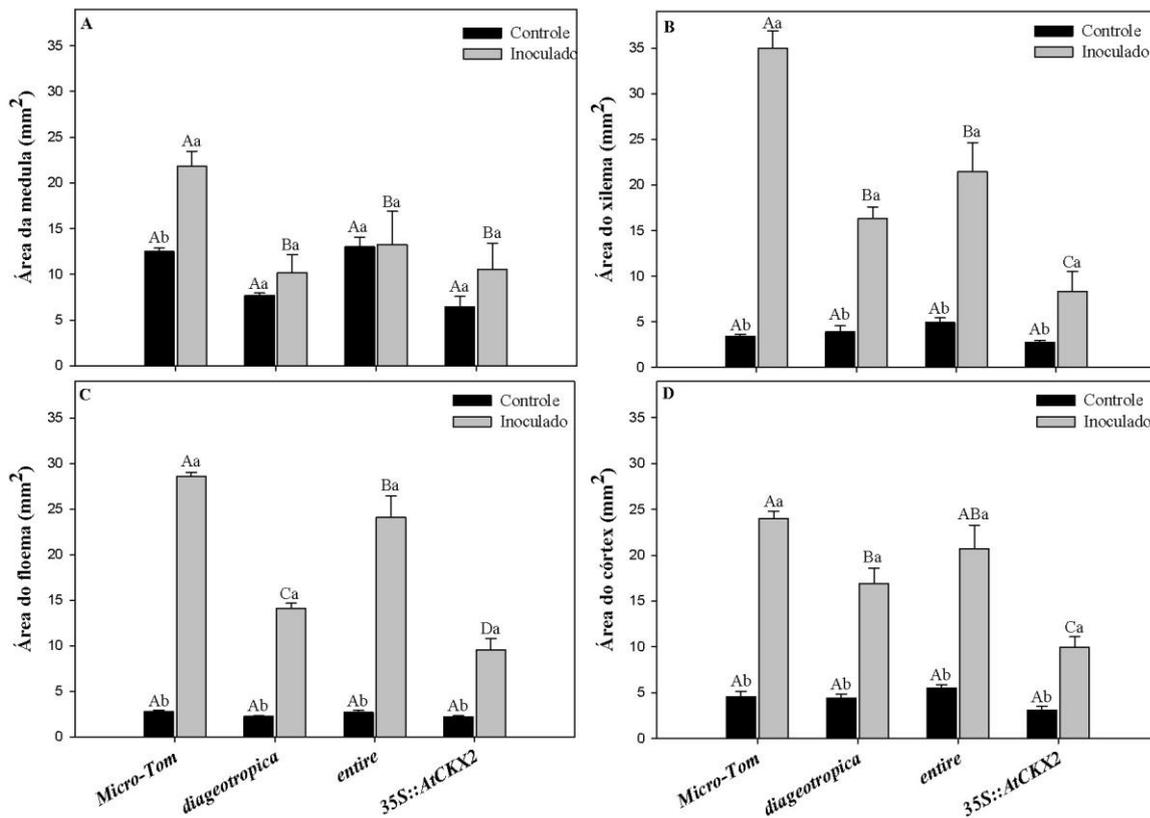
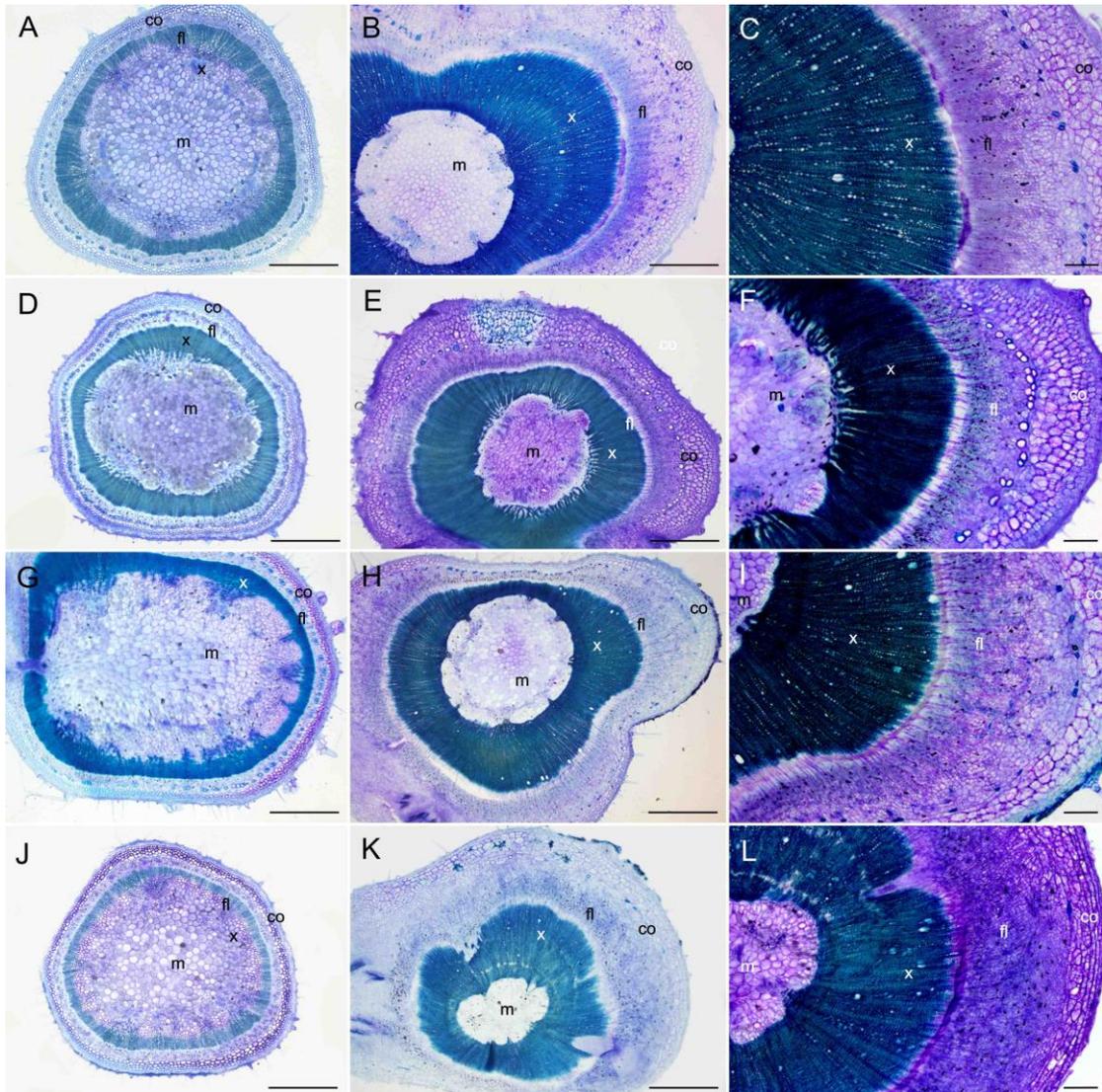


Figura 21 – Seção transversal do caule de ‘Micro-Tom’, mutantes e transgênico hormonal inoculados com *Moniliophthora perniciosa* aos 35 dias após inoculação. **A**: ‘Micro-Tom’ controle, **B-C**: ‘Micro-Tom’ inoculado, **D**: *diageotropica* controle, **E-F**: *diageotropica* inoculado, **G**: *entire* controle, **H-I**: *entire* inoculado, **J**: *35S::AtCKX2* controle, **K-L**: *35S::AtCKX2* inoculado. co:córtex, fl: floema, x: xilema e m: medula. Barras: A, B, E, H, J e K= 2mm; C, F, I, L= 0,5mm e D e J=1 mm



4.4 Resposta do MT à aplicação exógena de 6-benziladenina (BA), ácido naftaleno acético (ANA), 6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purine (LGR-991) e 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purine (PI-55) associado a infecção pelo *M. perniciosa* biótipo-S

Com o intuito de simular as possíveis alterações hormonais decorrentes do provável acúmulo de citocininas e/ou auxinas em MT causado pela infecção por *M. perniciosa*, foi conduzido um ensaio de aplicação exógena desses hormônios na região similar à inoculada

(ápice caulinar e gemas axilares). Versões sintéticas dos hormônios citocinina (BA) e auxina (ANA) que possuem maior resistência a degradação em condições naturais, foram aplicados no ápice caulinar e gemas axilares de plantas de tomateiro cv. MT, inoculadas ou não inoculadas com *M. perniciosa*. Além disso, foram utilizados dois inibidores de receptores de citocinina sintéticos (LGR-991 e PI-55), a fim de avaliar se a ação dos inibidores reduziria a expressão de sintomas do MT. Ensaio de aplicação exógena devem ser relativizados, pois sofrem do efeito da absorção dos hormônios, que não é possível estimar, e há efeitos importantes das doses e momentos de aplicação.

Inicialmente, foi realizado um experimento com doses crescentes de BA (0,05, 0,5, 1, 10 e 20 mM) aplicadas em dois momentos: após 17 dias de semeadura, 12 µL de soluções de BA foram aplicadas em dois sítios das plantas: no ápice caulinar (MA) e nas primeiras gemas axilares acima dos nós cotiledonares, e 10 dias após a primeira aplicação (40 µL de BA em dois sítios das plantas: no ápice caulinar e nas primeiras gemas axilares acima dos nós cotiledonares). Essas concentrações testadas foram baseadas em Roman et al. (2016). Na dose de 20 mM, houve um efeito significativo na redução da altura e no engrossamento do caule em relação às demais doses de BA. Dessa forma, foi selecionada a dose de 20 mM de BA para a realização do próximo experimento, com maior número de plantas por repetição. Vale ressaltar que foram avaliadas apenas a dose de 20 mM para ANA e 50 µM para LGR-991 e PI-55 e que essas concentrações foram baseadas em estudos de outros grupos (SPÍCHAL et al., 2009; NISLER et al., 2010; ROMAN et al., 2016). Sendo assim, os hormônios e inibidores foram aplicados inicialmente dois dias após inoculação e a cada dez dias após a primeira aplicação (DAA), sendo aplicados com 10, 20 e 30 DAA.

O efeito somatório da aplicação de 20 mM BA + ANA e em associação à inoculação reduziu significativamente o crescimento da parte aérea das plantas (Figuras 22), sendo que, o efeito na altura das plantas resultante da aplicação exógena juntamente com a inoculação do patógeno foi maior do que o efeito apenas dos hormônios. Já em relação à avaliação do diâmetro do caule, a maior média foi observada nas plantas tratadas com BA + ANA e BA + ANA + *M. perniciosa*, não diferindo entre si aos 55 DAA e diferindo dos demais tratamentos (Figuras 23).

Com relação à biomassa da raiz, as plantas tratadas com BA + ANA apresentaram a maior média diferindo de todos os tratamentos (Figura 24). Já a associação BA + ANA + *M. perniciosa* reduziu significativamente a biomassa radicular comparado ao tratamento BA + ANA, mas não diferiu do MT inoculado e controle (Figura 24). Os tratamentos BA + ANA e

BA + ANA + *M. perniciosa* reduziram a biomassa da parte aérea, mas não apresentaram diferença significativa em relação ao MT inoculado (Figura 25).

As plantas tratadas apenas com BA e BA + *M. perniciosa* cresceram menos que as plantas apenas inoculadas (Figura 22). O tratamento BA + *M. perniciosa* apresentou maior engrossamento do caule do que as plantas inoculadas e do que as plantas tratadas apenas com BA, diferindo significativamente (Figura 23). De forma similar ao MT inoculado, as plantas tratadas BA + *M. perniciosa* apresentaram redução na biomassa radicular, com menores valores médios, diferindo significativamente do MT controle (Figura 24). Já em relação à parte aérea, a maior média da biomassa foi observada no tratamento BA + *M. perniciosa*, diferindo do tratamento apenas com BA (Figura 25). O incremento na biomassa da parte aérea no tratamento BA + *M. perniciosa* pode ser evidenciado pela formação de uma estrutura no caule similar a uma galha (Figura 26). Vale ressaltar que nesse experimento, o crescimento da parte aérea das plantas controles foi menor do que o comumente observado nos ensaios.

Figura 22 – Altura média (cm) de plantas de tomateiro ‘Micro-Tom’ tratadas com 6-benziladenina (BA), ácido naftaleno acético (ANA), 6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purine (LGR-991) e 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purine (PI-55); e inoculadas com *Moniliophthora perniciosa* biótipo-S aos 55 dias após aplicação. Foram avaliadas três parcelas, com cinco plantas em cada parcela ($n=15$)

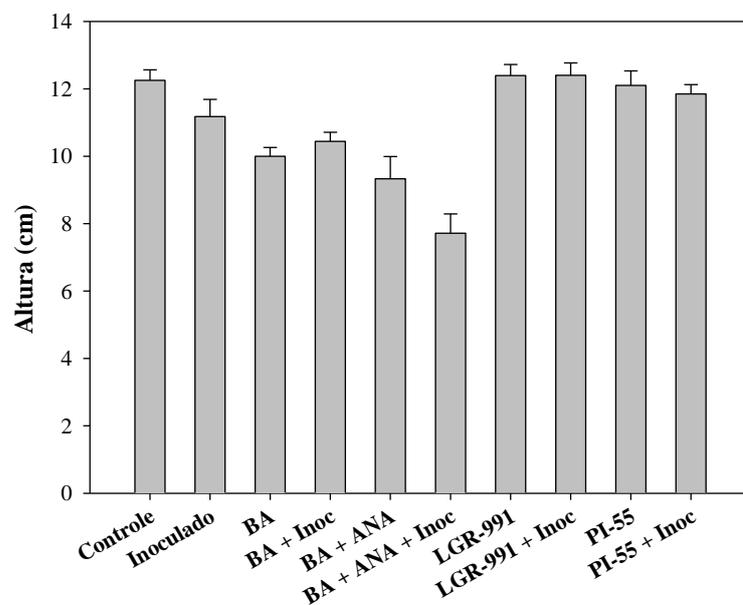


Figura 23 – Diâmetro médio (cm) de plantas de tomateiro ‘Micro-Tom’ tratadas com 6-benziladenina (BA), ácido naftaleno acético (ANA), 6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purine (LGR-991) e 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purine (PI-55); e inoculadas com *Moniliophthora perniciosa* biótipo-S aos 55 dias após aplicação. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Foram avaliadas três parcelas, com cinco plantas em cada parcela ($n=15$)

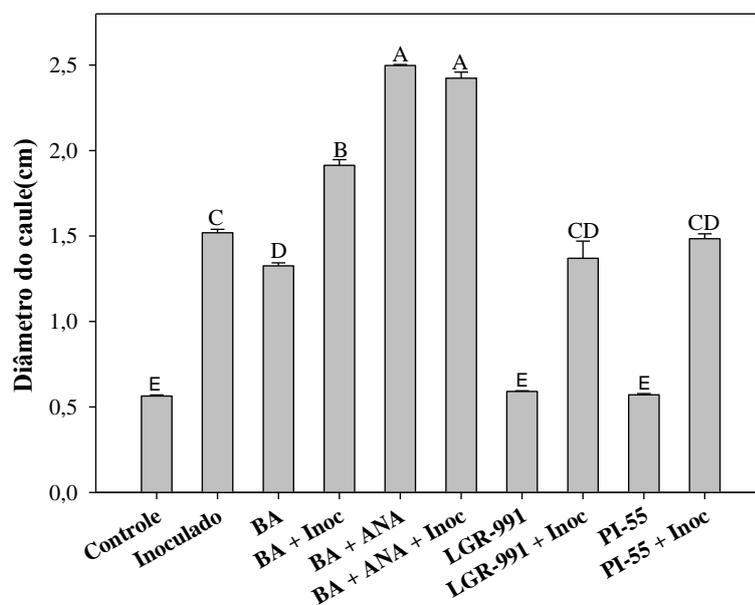


Figura 24 – Massa seca da raiz de plantas de tomateiro ‘Micro-Tom’ tratadas com 6-benziladenina (BA), ácido naftaleno acético (ANA), 6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purine (LGR-991) e 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purine (PI-55); e inoculadas com *Moniliophthora perniciosa* biótipo-S aos 55 dias após aplicação. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Foram avaliadas dez repetições biológicas ($n=10$)

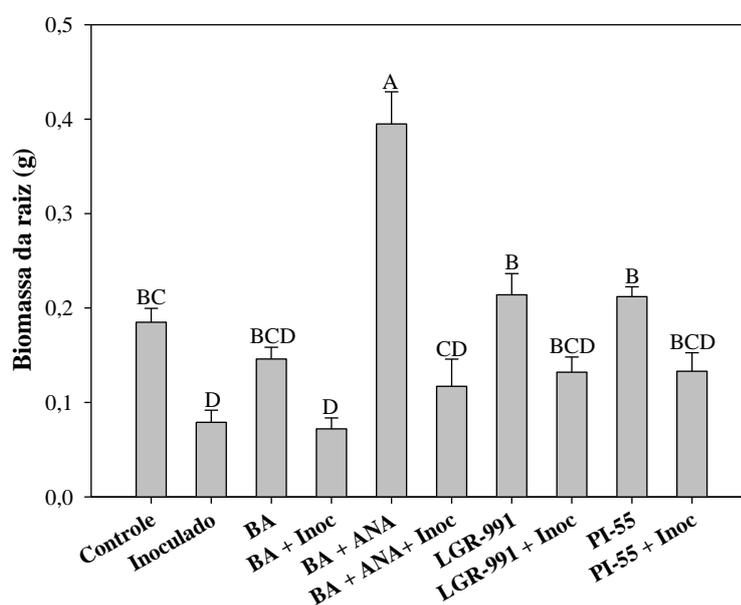


Figura 25 – Massa seca da parte aérea de plantas de tomateiro ‘Micro-Tom’ tratadas com 6-benziladenina (BA), ácido naftaleno acético (ANA), 6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purine (LGR-991) e 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purine (PI-55); e inoculadas com *Moniliophthora perniciosa* biótipo-S aos 55 dias após aplicação. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Foram avaliadas dez repetições biológicas ($n=10$)

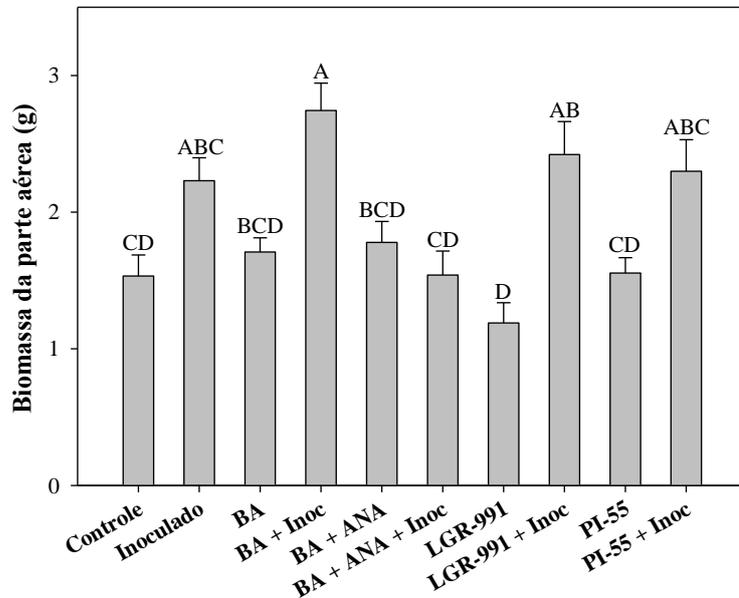
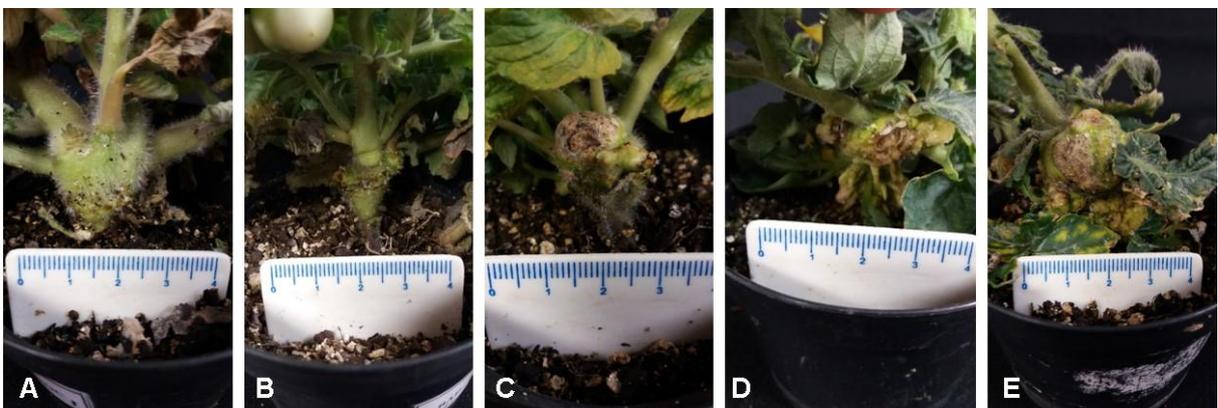


Figura 26 – Engrossamento do caule e pecíolo no tomateiro ‘Micro-Tom’ tratados com 6-benziladenina (BA), ácido naftaleno acético (ANA) e inoculadas com *Moniliophthora perniciosa* biótipo-S aos 55 dias após aplicação. Formação de uma estrutura no caule similar a uma galha nos tratamentos com BA + *M. perniciosa* e ANA + BA + *M. perniciosa*. A: MT inoculado, B: MT tratado com BA, C: MT inoculado e tratado com BA, D: MT tratado com ANA + BA e E: MT inoculado tratado com ANA + BA



A fim de explorar o efeito oposto ao da aplicação exógena de BA na interação MT x *M. pernicioso*, foram utilizados dois inibidores de receptores de citocinina. Os inibidores testados, LGR-991 e PI-55 são estruturalmente próximos ao BA, mas apresentam substituições em posições específicas nas cadeias laterais do anel aromático (SPÍCHAL et al., 2009; NISLER et al., 2010). PI-55 foi o primeiro inibidor do receptor *Cytokinin Response 1 (CRE1) / Arabidopsis Histidine Kinase 4 (AHK4)* que demonstrou bloquear a ação da citocinina *in vivo* (SPÍCHAL et al., 2009). Spíchal et al. (2009) demonstraram que este composto impediu a ligação da trans-zeatina (citocinina natural) no receptor *CRE1/AHK4* de *Arabidopsis* e reprimiu a indução de resposta a citocinina da construção *ARR5::GUS*. O LGR-991 atua da mesma forma que o PI-55, e além disso, demonstrou ser um inibidor competitivo de outro receptor de citocinina, o *AHK3* (NISLER et al., 2010). As aplicações destes dois inibidores foram realizadas com uma única dose, descrita em ensaios com rosa (ROMAN et al., 2016) em que nesse caso foram utilizadas as doses de 1 µM e 1 mM (ROMAN et al., 2016). No ensaio com o *M. pernicioso* foi utilizado a dose de 50 µM. Contudo, faz-se necessário avaliar a resposta de doses crescentes a fim de definir qual a dose/resposta mais indicada.

Dessa forma, as aplicações dos dois inibidores em MT inoculadas demonstraram um pequeno efeito no crescimento, havendo diferença na altura, em que, plantas tratadas com os inibidores e inoculadas apresentaram valores médios para altura maiores que o MT inoculado (Figura 22). Contudo, não houve um efeito significativo no aumento da biomassa da parte aérea quando comparado ao MT inoculado (Figura 25). Já na biomassa da raiz, houve um pequeno efeito no aumento da biomassa comparado ao MT inoculado, porém sem diferença significativa (Figura 24). O efeito da aplicação dos dois inibidores + *M. pernicioso* e do BA foi o mesmo na biomassa radicular (Figura 24).

O tratamento das plantas inoculadas com LGR-991 mostrou uma tendência na redução do engrossamento do caule quando comparado ao MT inoculado, ao tratamento com PI-55 e aos tratamentos com BA e ANA (Figura 23). Contudo, apesar da média de diâmetro do caule aos 55 DAA no LGR-991 + *M. pernicioso* ser um pouco menor que as plantas apenas inoculadas e tratadas com PI-55, não foi possível observar significância (Figura 23).

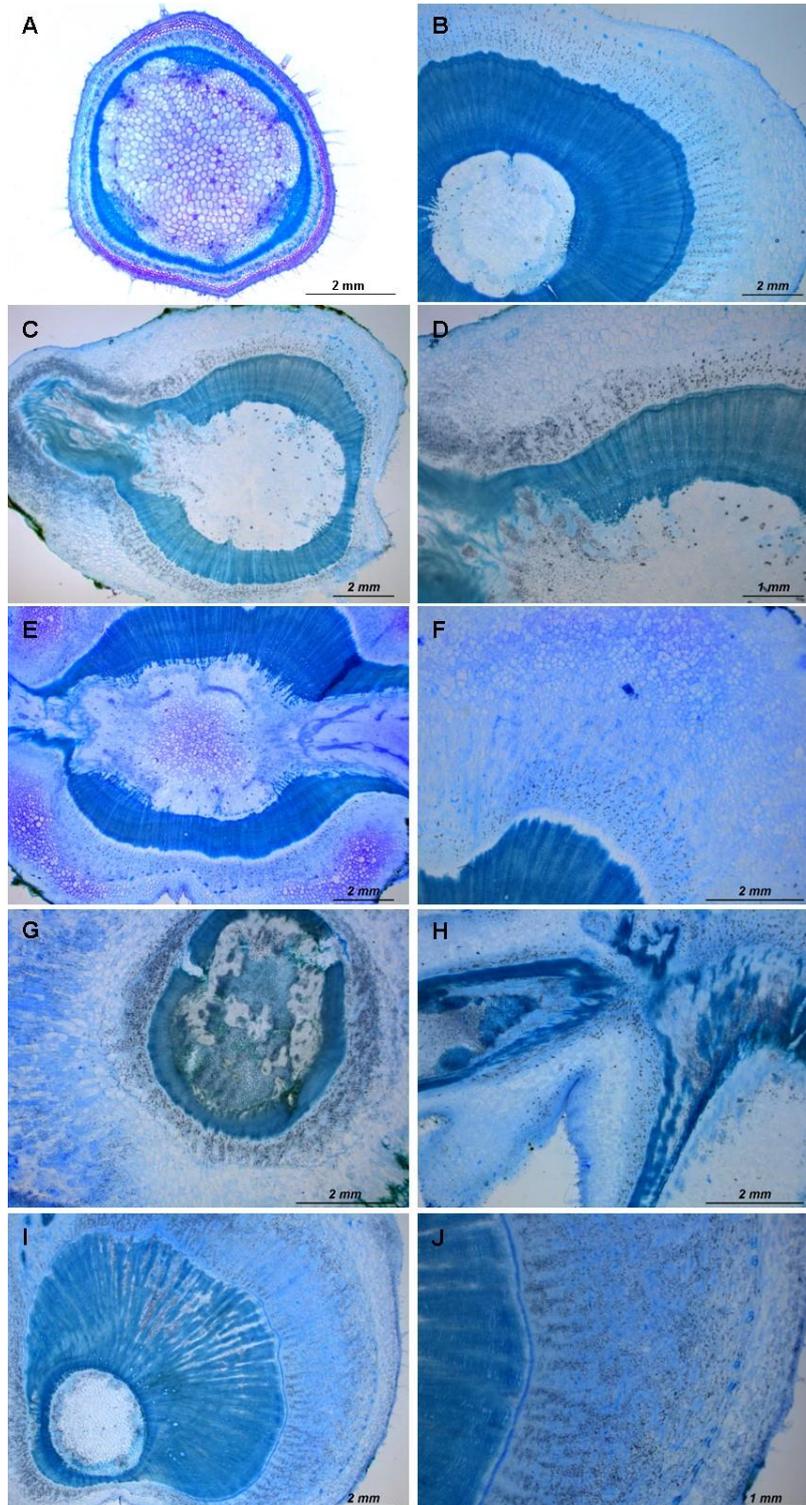
De forma a entender os efeitos da aplicação exógena de citocinina e auxina, as amostras dos tratamentos com a aplicação de 20 mM BA e BA + ANA no desenvolvimento dos tecidos do caule, amostras foram analisadas histologicamente (Figura 27). A análise da seção do caule tratado com 20 mM de BA demonstra uma grande proliferação celular do córtex e, de forma menos intensa do xilema e floema (Figura 27C-D), similar ao observado

em MT inoculado (Figura 27B) e contrastante ao controle (Figura 27A). Já na associação da inoculação mais o tratamento com BA, o maior engrossamento do caule aos 55 DAA está relacionado à maior proliferação das células do córtex e floema (Figura 27E-F) comparado ao MT inoculado e tratado apenas com BA.

As plantas tratadas com 20 mM de BA + ANA demonstraram um padrão irregular de formação do caule, com grande desenvolvimento de células parenquimáticas (Figura 27G-H). Contudo, este tratamento associado à inoculação mostrou um padrão similar da histologia do caule do MT inoculado, com grande proliferação de células do xilema e floema (Figura 27I-J).

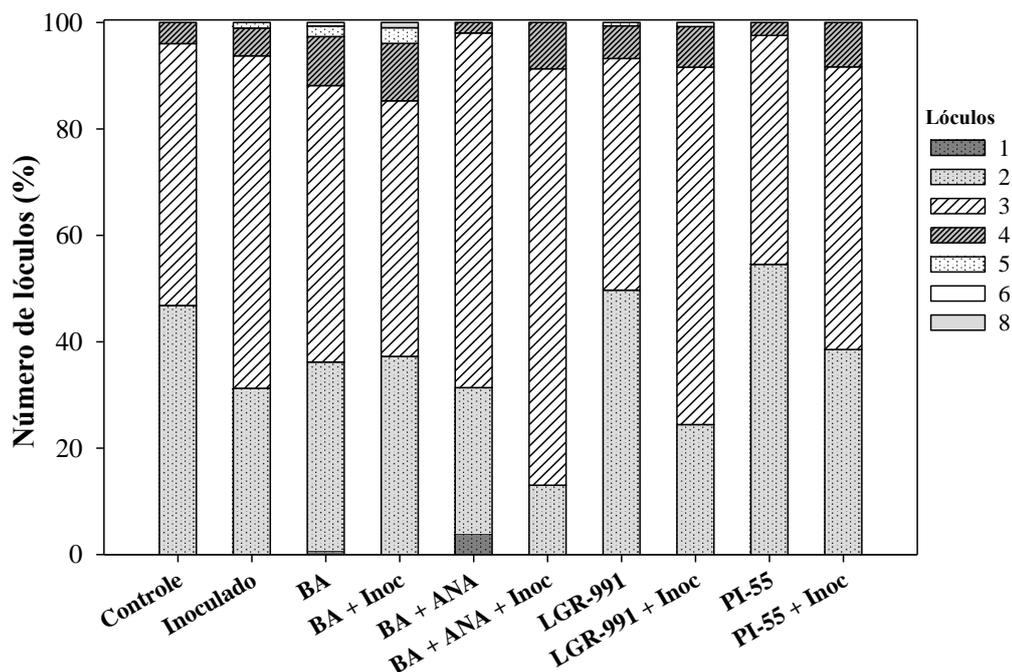
Dessa forma, o efeito BA é similar ao efeito apenas da infecção pelo *M. pernicioso* no aumento dos tecidos do xilema, floema e córtex, sendo que a associação do BA + *M. pernicioso* apresentou um maior aumento no floema e córtex. Já o tratamento com BA + ANA + *M. pernicioso* apresentou um efeito maior no aumento do xilema e floema comparado ao efeito apenas da infecção. Sendo assim, o aumento nos níveis de citocinina e auxina exógenas induziram a maior proliferação de células do xilema, floema e córtex, simulando o efeito da infecção pelo *M. pernicioso*.

Figura 27 – Seção transversal do caule de ‘Micro-Tom’ (MT) sob o efeito da aplicação exógena de 6-benziladenina (BA), ácido naftaleno acético (ANA), 6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purine (LGR-991) e 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purine (PI-55); e inoculadas com *Moniliophthora perniciosa* biótipo-S aos 55 dias após aplicação. **A:** MT, **B:** MT inoculado, **C-D:** MT tratado com BA, **E-F:** MT inoculado e tratado com BA, **G-H:** MT tratado com BA e ANA; **I-J:** MT inoculado e tratado com BA e ANA



Os frutos oriundos de plantas tratadas com citocinina e auxina sintéticas, BA e ANA, inibidores de receptores de citocinina, LGR-991 e PI-55 e em associação ao *M. perniciosa* também foram avaliados para número de lóculos. O tratamento com 20 mM de BA e 20 mM BA + *M. perniciosa* mostraram a maior distribuição no número de lóculos nos frutos dentre os tratamentos analisados. A variação foi de 1 a 6 lóculos no tratamento com BA e de 2 a 8 lóculos no tratamento com BA + *M. perniciosa* (Figura 28). Os frutos oriundos de plantas tratadas com LGR-991 e LGR-991 + *M. perniciosa* apresentaram um padrão no número de lóculos similar ao MT inoculado (2 a 5 lóculos), com variação de 2 a 5 lóculos e 2 a 6 lóculos, respectivamente (Figura 28). Já os frutos oriundos de plantas tratadas com PI-55, PI-55 + *M. perniciosa*, 20 mM BA + ANA + *M. perniciosa* apresentaram menores distribuições no número de lóculos com variação de 2 a 4 lóculos (Figura 28). As plantas tratadas apenas com BA + ANA apresentaram variação de 1 a 4 lóculos nos frutos (Figura 28).

Figura 28 – Quantidade de lóculos nos frutos ‘Micro-Tom’ sob o efeito da aplicação exógena de 6-benziladenina (BA), ácido naftaleno acético (ANA), 6-(2,5-dihydroxybenzylamino)purine (LGR-991) e 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purine (PI-55); e inoculadas com *Moniliophthora perniciosa* biótipo-S aos 55 dias após aplicação. Número de lóculos (%) correspondem as observações em porcentagem da quantidade de lóculos observada em relação ao total de frutos analisados por tratamento. Micro-Tom controle e inoculado, $n= 126$ e 96 frutos, respectivamente; BA, $n= 152$ frutos; BA + Inoc, $n= 102$ frutos; BA + ANA, $n= 51$ frutos; BA + ANA + Inoc, $n= 23$ frutos; LGR-991, $n= 163$ frutos; LGR-991 + Inoc, $n= 131$ frutos; PI-55, $n= 165$ frutos; e PI-55 + Inoc, $n= 96$ frutos



Portanto, apenas a aplicação de 20 mM BA mostrou redução no crescimento e aumento na distribuição do número de lóculos nos frutos. Na associação da inoculação e aplicação de BA houve um maior efeito na biomassa da parte aérea, no número de lóculos dos frutos e no engrossamento do caule, evidenciado pela maior proliferação de células do floema e córtex e formação de uma estrutura similar a uma galha. O efeito da aplicação exógena de 20 mM BA + 20 mM ANA no ápice caulinar e gemas laterais parece simular o efeito da infecção por *M. perniciosa*, vistos pela maior redução no crescimento e maior engrossamento do caule. Esse mesmo fenótipo foi observado nas plantas tratadas com os dois hormônios e inoculadas. Além disso, a aplicação exógena de BA + ANA + *M. perniciosa* mostrou o efeito do patógeno e dos hormônios na alta proliferação de células do xilema e floema comparado ao MT inoculado.

Embora tenha sido observada uma tendência de diminuição no engrossamento do caule de plantas tratados com LGR e inoculadas, a dose de 50 μ M aplicada dos dois inibidores nas plantas inoculadas não mostraram efeitos significativos na redução do engrossamento do caule, no número de lóculos dos frutos e não apresentaram diferença significativa em relação ao MT inoculado no incremento da biomassa radicular. Assim, seria necessário avaliar doses maiores e menores desses inibidores em plantas inoculadas.

Esses resultados demonstram que o engrossamento do caule, resulta do aumento dos tecidos do xilema, floema e córtex, o que aparentemente sugere que seja por hipertrofia e hiperplasia, sendo dependente do acúmulo de citocinina e auxina. Já havia sido demonstrado que os níveis de zeatina ribosídeo aumentaram nos estágios iniciais da doença em cacauero suscetível (ORCHARD et al., 1994). *Cytokinin oxidases (CKXs)* aparecem sob elevada indução em vassouras verdes (TEIXEIRA et al., 2014) e almofadas florais (MELNICK et al., 2012). Níveis elevados de auxina em basidiocarpos e em folhas de cacauero infectadas pelo *M. perniciosa* foram descritos (KILARU; BAILEY; HASENSTEIN, 2007). Por outro lado, peroxidases e lacases capazes de degradar auxinas foram identificadas produzidas pelo micélio de *M. perniciosa* em meio de cultura (KRUPASAGAR; SEQUEIRA, 1969).

4.5 Localização histoquímica da sinalização por citocinina e auxina

O gene repórter *uidA* (β -glucuronidase) é uma ferramenta analítica útil, pois sua atividade e localização podem ser visualizadas tratando o tecido com um substrato que produz uma coloração azul quando hidrolisado pela enzima β -glucuronidase (ULMASOV et al.,

1997). Para analisar a sinalização dos hormônios citocinina e auxina, que parecem estar relacionados à patogênese, foram realizados ensaios de localização histoquímica com duas linhas transgênicas no background genético de MT que contêm o gene repórter *uidA* (*GUS*) sob o controle de promotores induzidos por citocinina [*ARR5::GUS*, linha transgênica produzida pelo Prof. Dr. Lázaro Peres (ESALQ/USP) e a construção gênica foi cedida pelo Prof. Dr. Joseph J. Kieber (Universidade da Carolina do Norte, Chapel Hill, EUA)] ou auxina [*DR5::GUS*, linha transgênica produzida pelo Prof. Dr. Jose Luis Garcia-Martinez (Universidade Politécnica de Valencia, Espanha)]. Este ensaio permite visualizar a sinalização e como consequência a localização do efeito destes hormônios no hospedeiro a partir da indução dos promotores e expressão do gene *GUS*.

Inicialmente, foram testados oito tempos de exposição ao tampão (1,5; 3; 6; 9; 12; 15 e 18 h) e dois tratamentos (com vácuo e sem vácuo) para identificar o tempo ideal de exposição ao tampão que melhor apresentava coloração e contraste. Assim, foi observado que o tempo ideal de exposição ao tampão foi de 9 h para o *ARR5::GUS* e 12 h para *DR5::GUS*, sendo que, o tratamento com vácuo permitiu a obtenção de melhores resultados. A partir disso, foram avaliados 12 tempos de coleta na interação dos genótipos com o *M. perniciosa*, em que foram coletadas cinco plantas inoculadas e cinco plantas controles (sem inoculação) em cada ponto, aos 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 120, 192, 240 e 360 HAI para *ARR5::GUS* e *DR5::GUS*, em dois experimentos independentes.

Foi observado que houve uma sinalização diferencial por citocinina e auxina por meio da indução do promotor *ARR5* e *DR5* nas plantas inoculadas quando comparadas com o controle. Dos 12 tempos avaliados, apenas 24 e 36 HAI houve sinalização diferencial por citocinina e 48 HAI por auxina no tratamento inoculado em relação ao controle. Em 24 HAI (Figura 29), a sinalização por citocinina detectada foi mais forte do que em 36 HAI (Figura 30). Em 24 HAI, foi detectada maior expressão de *GUS* nas raízes das plantas inoculadas (Figura 29G), hipocótilo (Figura 29H), caule (Figura 29I), nervuras (Figura 29J-K) e ápice caulinar (Figura 29L). Já no tratamento controle, foi observado uma coloração tênue de *GUS* na raiz (Figura 29A) e nervuras (Figura 29D-E), mas com fraca coloração quando comparado nos mesmos tecidos do inoculado.

A 36 HAI, as plantas não inoculadas apresentaram sinalização por citocinina apenas na raiz, com coloração bem fraca (Figura 30A-D). Provavelmente, esta sinalização tenha ocorrido, tanto as 24 HAI, quanto a 36 HAI, pois a raiz é a região da planta de maior síntese de citocininas livres (STADEN; DAVEY, 1979). Por outro lado, plantas inoculadas ativaram a expressão do *GUS* na raiz (Figura 30E), pecíolo (Figura 30F), nervuras (Figura 30F-G) e

ápice caulinar (Figura 30H). Sendo assim, a maior expressão de *GUS* nas plantas inoculadas nos momentos iniciais da interação (24 e 36 HAI), indicam a sinalização diferencial por citocinina na interação tomateiro x *M. perniciosa*. Esses resultados demonstraram que a presença do patógeno no hospedeiro induz uma sinalização mais intensa de citocinina, o que possivelmente associa-se ao efeito da citocinina no desenvolvimento dos sintomas. Esse ensaio é visual e existe atividade de fundo nas plantas que dificulta uma avaliação qualitativa. Faz-se necessário uma avaliação quantitativa para detectar a atividade da enzima.

Já para a sinalização por auxina em *DR5::GUS* houve uma clara diferença no nível de expressão de *GUS* entre as plantas inoculadas e controles (Figura 31). Esta sinalização por auxina, diferenciada no tratamento inoculado em relação ao controle, ocorre apenas a 48 HAI, posterior a sinalização por citocinina, quando na *DR5::GUS* foi visualizada uma maior expressão de *GUS* na raiz (Figura 31F), hipocótilo (Figura 31G), caule (Figura 31H), pecíolo e nervuras (Figura 31I) e ápice caulinar (Figura 31J) no tratamento inoculado, não sendo possível observar nenhuma coloração ou uma coloração tênue nos mesmos tecidos das plantas controles (Figura 31A-E).

Há uma maior expressão do *GUS* nas plantas *DR5::GUS* inoculadas em relação às plantas controles (não inoculadas) na raiz, hipocótilo, caule, folha e ápice caulinar no período de 48 HAI, evidenciando o efeito da sinalização por auxina na interação. Este resultado corrobora os resultados obtidos de engrossamento do caule para os mutantes de auxina (*diageotropica* e *entire*) que diferem significativamente do MT. Estudo similar realizado por Marelli et al. (2009) mostrou uma maior expressão do *GUS* na zona de engrossamento do caule, especificamente no xilema primário.

Figura 29 - *ARR5::GUS* mostrando expressão do *GUS* em diferentes tecidos 24 h após inoculação. A-F: *ARR5::GUS* na planta controle. G-L: *ARR5::GUS* na planta inoculada com *Moniliophthora perniciosa*

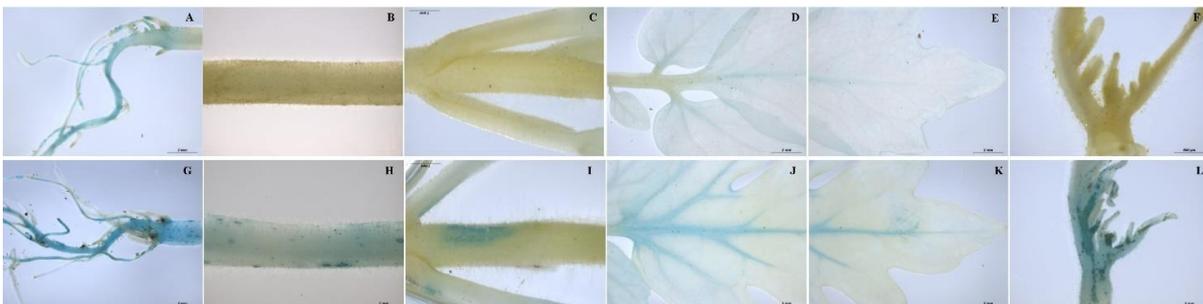


Figura 30 - *ARR5::GUS* mostrando expressão do *GUS* em diferentes tecidos 36 h após inoculação. A-D: *ARR5::GUS* na planta controle. E-H: *ARR5::GUS* na planta inoculada com *Moniliophthora perniciosa*

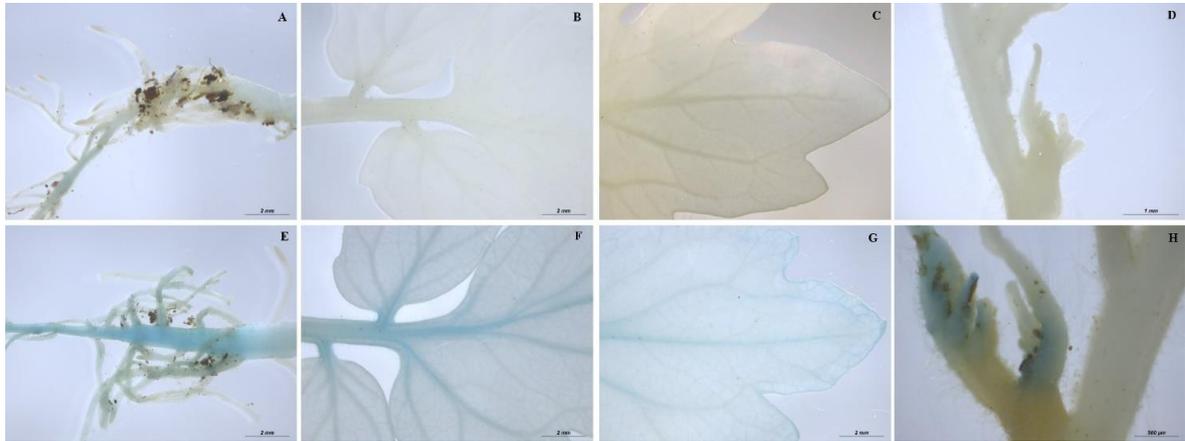
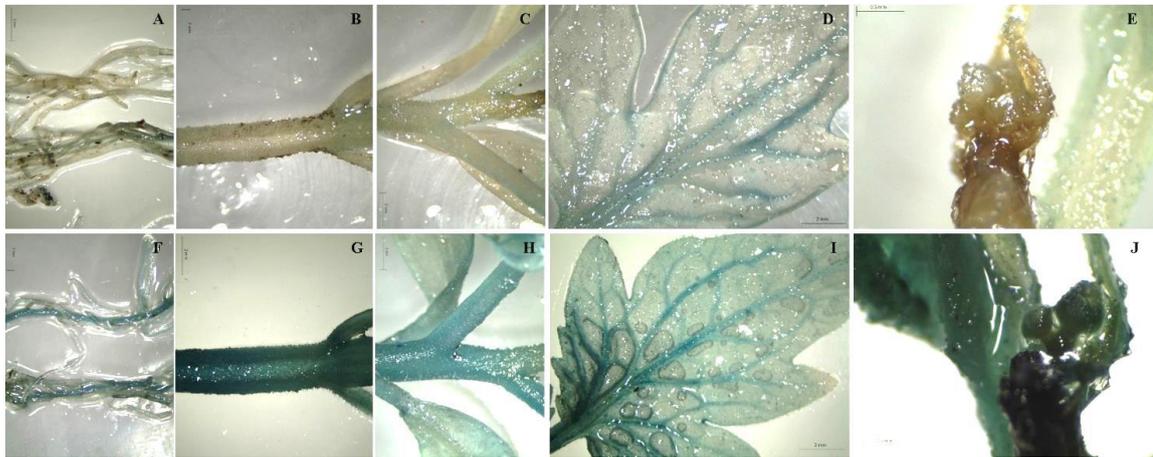


Figura 31 - *DR5::GUS* mostrando expressão do *GUS* em diferentes tecidos 48 horas após inoculação. A-E: *DR5::GUS* na planta controle. F-J: *DR5::GUS* na planta inoculada com *Moniliophthora perniciosa*



Em suma, é possível afirmar que ocorre sinalização diferencial de citocinina e auxina nas plantas inoculadas quando comparadas com as plantas controles, o que evidencia que estes dois hormônios estão atuando no desenvolvimento dos sintomas a partir de 5 DAI. É sugerido ainda que uma sinalização inicial de citocinina ocorre previamente ao desencadeamento da sinalização por auxina.

4.6 Quantificação dos hormônios vegetais [ácido abscísico (ABA), ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico (AS) e auxina]

Com a demonstração que os hormônios vegetais auxina e citocinina estão associados à patogênese do tomateiro cv. MT por *M. perniciosa* foi realizada a quantificação dos hormônios ABA, AJ, AS, auxina, citocininas e giberelinas, com o objetivo de confirmar a alteração dos níveis desses hormônios, particularmente auxina e citocinina, mas também seus potenciais efeitos nos níveis de outros hormônios (*cross-talk*). Foram analisadas amostras durante o desenvolvimento dos sintomas (5 d, 10 d, 20 d e 30 DAI) de MT e em 30 DAI nos mutantes com alterações na percepção à auxina, *diageotropica* e *entire*, e no transgênico com reduzidos níveis de citocinina, *35S::AtCKX2*. Esses hormônios também foram quantificados na massa do micélio necrotrófico do isolado do biótipo-S coletado em Tiradentes.

Inicialmente foi realizada a quantificação de auxina no MT e no *35S::AtCKX2* durante o desenvolvimento dos sintomas (5-30 DAI). Posteriormente, foi realizado outro experimento para a quantificação de todos os hormônios citados acima no MT, mutantes, transgênico e no micélio do *M. perniciosa*. Contudo, até o momento foram obtidas apenas as quantificações dos hormônios ABA, AJ, AS e auxina.

O MT inoculado apresentou maiores níveis de auxina com diferença significativa em 5 d, 10 d e 20 DAI em relação ao controle, sendo que, a quantidade de auxina no MT inoculado é maior em 5 DAI do que nos demais tempos avaliados (Figura 32). Assim, na interação *M. perniciosa* x tomateiro há uma tendência de decréscimo no acúmulo de auxina durante o desenvolvimento dos sintomas. Já para o transgênico *35S::AtCKX2*, as plantas inoculadas apresentaram acúmulo de auxina somente no início do desenvolvimento dos sintomas (5 e 10 DAI) diferindo do controle (Figura 32). Sinalização por auxina foi induzida pelo *M. perniciosa* 48 HAI em vários tecidos na linha transgênica *DR5::GUS*.

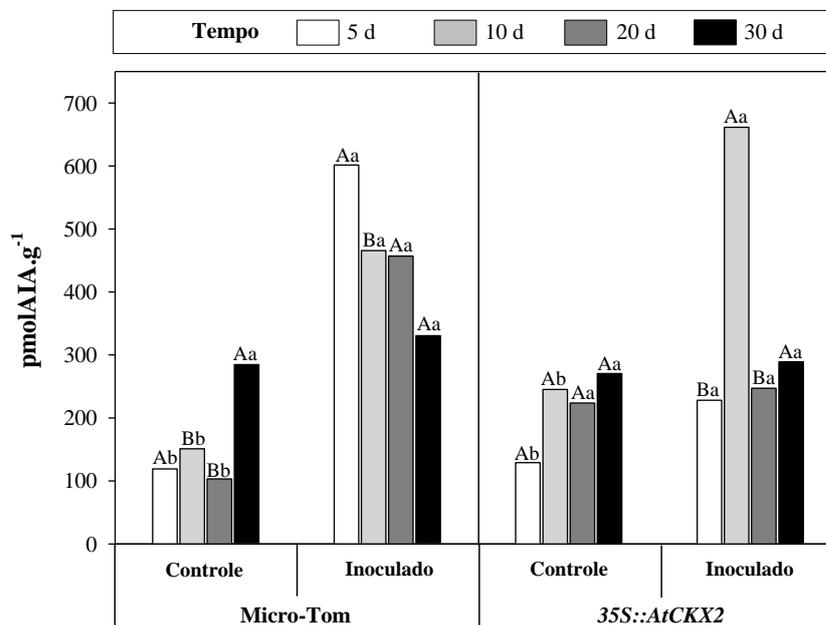
Comparando os dois genótipos inoculados, o MT apresenta três vezes mais acúmulo de auxina aos 5 DAI em relação ao *35S::AtCKX2* (Figura 32). Aos 10 DAI, o transgênico *35S::AtCKX2* apresentou aproximadamente 1,4 vezes mais auxina do que o MT, já em 20 DAI o MT acumulou aproximadamente 1,85 vezes mais auxina do que o transgênico *35S::AtCKX2* (Figura 32). Em 30 DAI não houve diferença significativa entre os dois genótipos.

O aumento nos níveis de auxina pela infecção por *M. perniciosa* deve estar relacionado ao desenvolvimento dos sintomas no tomateiro, visto que em 48 HAI, existe sinalização diferencial medida por GUS e ocorre o aumento nos níveis de auxina de 5 DAI até

20 DAI, evidenciando o efeito desse hormônio na proliferação das células do xilema e floema e, conseqüentemente no engrossamento do caule. Por outro lado, os níveis de auxina foram menores no *35S::AtCKX2*, que por sua vez, apresentou menor diâmetro do caule e menores médias de área de xilema, floema e córtex, sugerindo assim, uma correlação positiva entre engrossamento do caule e incremento nos níveis de auxina.

Segundo Chanclud e Morel (2016), auxinas estão envolvidas em interações planta x patógeno que causam deformações em órgãos, como formação de tumores ou galhas em seus hospedeiros. Citocininas e auxinas contribuem ativamente para a virulência de *Agrobacterium tumefaciens* e *Pseudomonas savastanoi*, os quais induzem a formação de tumores ou galhas no hospedeiro (GLASS; KOSUGE, 1988). Neste estudo, foi visto que o *M. perniciosa* induz uma deformação (engrossamento) no caule e pecíolo, provável resultado do efeito dos hormônios citocinina e auxina, a qual está possivelmente associada à hiperplasia e hipertrofia do sistema vascular e córtex. Ocorre a produção de auxina em basidiocarpos e em folhas de cacauero infectadas pelo *M. perniciosa* (KILARU; BAILEY; HASENSTEIN (2007) e, indução de genes de resposta à auxina em vassouras verdes foi descrita por Teixeira et al. (2014).

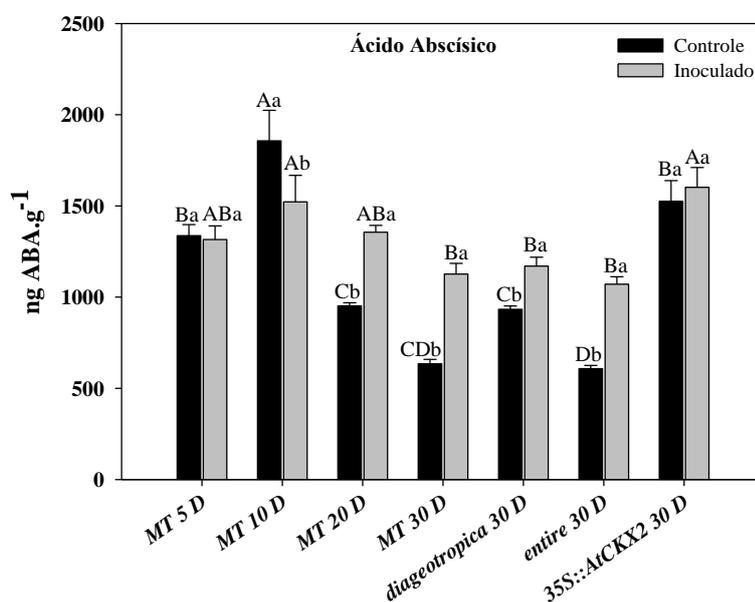
Figura 32 – Quantificação de auxina (Ácido Indol 3-Acético) no MT e no transgênico *35S::AtCKX2* inoculados com *Moniliophthora perniciosa* biótipo-S durante o desenvolvimento dos sintomas. Colunas seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). i) Letras maiúsculas – comparação entre genótipos na mesma condição (inoculado ou controle); ii) Letras minúsculas – comparação de cada genótipo inoculado em relação ao controle e no mesmo tempo de avaliação. Foram avaliadas três repetições biológicas



A quantificação de ABA mostrou que houve acúmulo deste hormônio no MT inoculado apenas em 20 e 30 DAI, diferindo do controle (Figura 33). Nos mutantes de auxina, diageotropica e entire, houve um incremento de ABA aos 30 DAI no inoculado em relação ao controle (Figura 33). Já no transgênico *35S::AtCKX2*, não houve diferença significativa no inoculado em relação ao controle (Figura 30). Comparando os genótipos inoculados, houve maior acúmulo de ABA no MT inoculado 10 DAI e no *35S::AtCKX2* 30 DAI diferindo do MT, diageotropica e entire aos 30 DAI, que apresentaram menor acúmulo de ABA (Figura 33).

Em interações planta x patógeno, ABA pode afetar na resistência ou suscetibilidade do hospedeiro em consequência do *crosstalk* entre ABA e os hormônios de defesa (AJ, AS ou etileno) (KAZAN; LYONS, 2014). No patossistema *Zea mays* x *Ustilago maydis* (biotrófico) o aumento nos níveis de ABA correlaciona com a virulência do fungo (MORRISON et al., 2015). ABA atua na suscetibilidade de vários patógenos necrotróficos como, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*, enquanto que na interação arroz x *Cochliobolus miyabeanus* promove a resistência (DE VLEESSCHAUWER et al., 2010). Na interação do fungo hemibiotrófico *Magnaporthe grisea* x arroz, o ABA aumentou a suscetibilidade (JIANG et al., 2010).

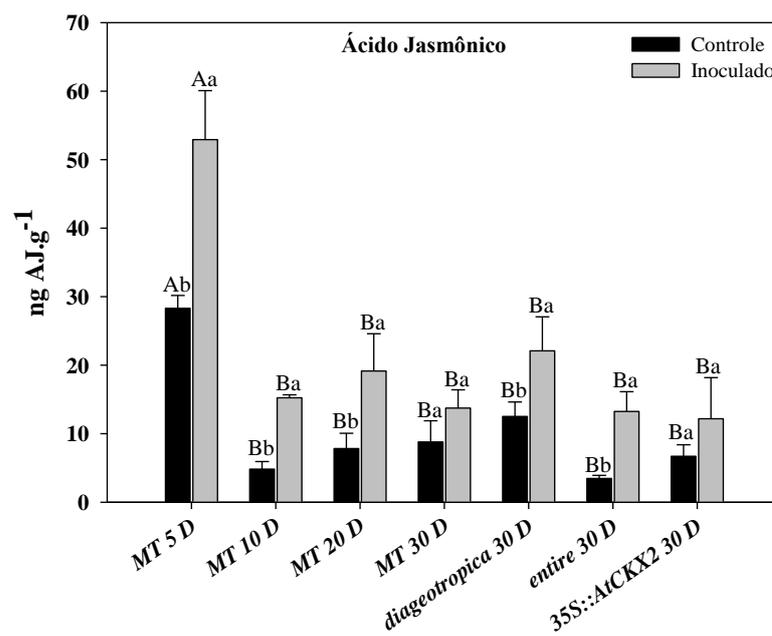
Figura 33 – Quantificação de ácido abscísico (ABA) no MT, nos mutantes, *diageotropica* e *entire*, e no transgênico *35S::AtCKX2* inoculados com *Moniliophthora perniciosa* biótipo-S durante o desenvolvimento dos sintomas. Colunas seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). i) Letras maiúsculas – comparação entre genótipos na mesma condição (inoculado ou controle); ii) Letras minúsculas – comparação de cada genótipo inoculado em relação ao controle e no mesmo tempo de avaliação. Foram avaliadas cinco repetições biológicas



A quantificação de JA mostrou que houve maior acúmulo deste hormônio no MT inoculado em 5, 10 e 20 DAI, diferindo do controle (Figura 34). Nos mutantes de auxina, *diageotropica* e *entire*, houve um incremento de AJ aos 30 DAI no inoculado em relação ao controle (Figura 34). Já no transgênico, *35S::AtCKX2* não houve diferença significativa no inoculado em relação ao controle (Figura 34).

Comparando os genótipos inoculados, houve maior acúmulo de AJ apenas no MT inoculado 5 DAI diferindo significativamente dos demais tratamentos. Este resultado sugere o que o incremento do AJ apenas no início do desenvolvimento dos sintomas seja associado aos mecanismos de defesa contra o *M. perniciosa*. Mecanismos de resistência contra *M. perniciosa* em cacaueteiro parecem ser mediados pela sinalização por AJ (LITHOLDO JUNIOR et al., 2015). Contudo, a resposta de defesa mediada por AJ parece ser inefetiva, visto que o MT é suscetível ao biótipo-S do *M. perniciosa*. De modo geral, a resposta de defesa do hospedeiro em interações com patógenos necrotróficos é mediada por AJ (ROBERT-SEILANIANTZ; GRANT; JONES, 2011).

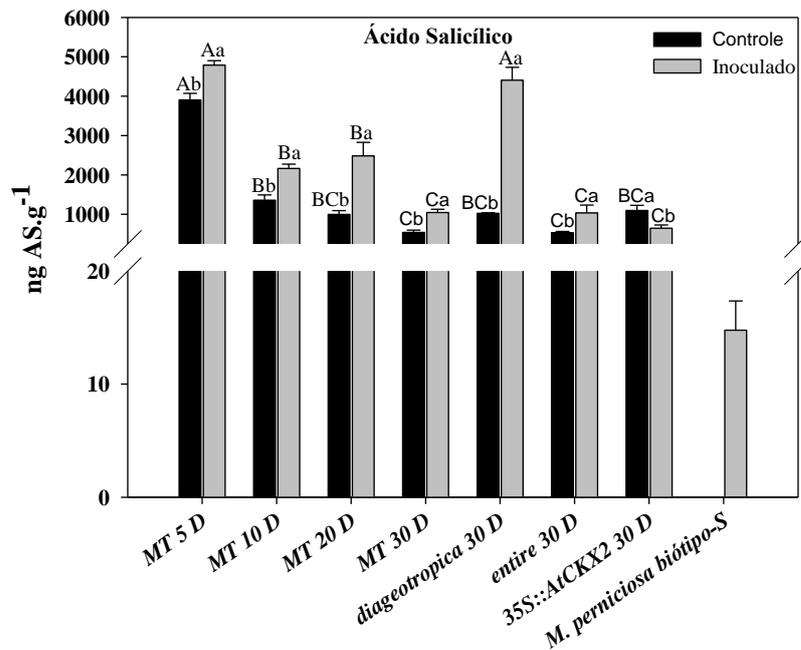
Figura 34 – Quantificação de ácido jasmônico (AJ) no MT, nos mutantes, *diageotropica* e *entire*, e no transgênico *35S::AtCKX2* inoculados com *Moniliophthora perniciosa* biótipo-S durante o desenvolvimento dos sintomas. Colunas seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). i) Letras maiúsculas – comparação entre genótipos na mesma condição (inoculado ou controle); ii) Letras minúsculas – comparação de cada genótipo inoculado em relação ao controle e no mesmo tempo de avaliação. Foram avaliadas cinco repetições biológicas



A quantificação de AS mostrou que houve maior acúmulo deste hormônio no MT inoculado em todos os períodos do desenvolvimento dos sintomas avaliados, diferindo significativamente do controle (Figura 35). Nos mutantes de auxina *diageotropica* e *entire* inoculados também houve incremento dos níveis de AS (Figura 35). No transgênico com reduzidos níveis de citocinina, *35S::AtCKX2*, ocorreu o contrário: o inoculado acumulou menos AS que o controle (Figura 32). Comparando todos os genótipos inoculados, em MT 5 DAI e *diageotropica* 30 DAI houve um maior acúmulo de AS, sendo que em MT, há uma tendência de decréscimo nos níveis de AS com o progresso da infecção (Figura 35). Houve um menor acúmulo de AS no genótipo com menor percentual de sintomas, *35S::AtCKX2*, no *entire* e no MT aos 30 DAI (Figura 35).

Dentre os hormônios analisados, apenas AS foi detectado no micélio dicariótico do *M. pernicioso*. Este resultado corrobora com Chaves e Gianfagna (2007) que identificaram AS no micélio de dez isolados do *M. pernicioso* biótipo-C, sendo que os níveis de AS foram de 0,3 a 2,2 ng g⁻¹ (peso fresco) entre os isolados. Kilaru et al. (2007) também identificou aproximadamente 0,5 µg.g⁻¹ peso seco de AS no micélio do biótipo-C. O biótipo-C de *M. pernicioso* cresce em meio contendo AS e ocorre acúmulo progressivo de AS em cacauero infectado de 5 d a 10 DAI (KILARU et al., 2007), sendo que, houve um acúmulo de cinco vezes mais AS em vassouras verdes do que em tecidos saudáveis de cacauero (CHAVES; GIANFAGNA, 2007). Kilaru et al. (2007) ressaltam que a habilidade do *M. pernicioso* de produzir, crescer e aumentar os níveis endógenos de auxina e AS no hospedeiro durante o processo de infecção pode estar relacionado com a patogenicidade do *M. pernicioso*. Visto que, o biótipo-S produz AS e que os níveis desse hormônio aumentaram durante a infecção no MT, sugere-se que o maior acúmulo de AS no MT inoculado pode ser derivado do *M. pernicioso* e que esse hormônio pode ter um papel na patogenicidade.

Figura 35 – Quantificação de ácido salicílico (AS) no MT, nos mutantes, *diageotropica* e *entire*, e no transgênico *35S::AtCKX2* inoculados com *Moniliophthora perniciosa* biótipo-S durante o desenvolvimento dos sintomas. Colunas seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). i) Letras maiúsculas – comparação entre genótipos na mesma condição (inoculado ou controle); ii) Letras minúsculas – comparação de cada genótipo inoculado em relação ao controle e no mesmo tempo de avaliação. Foram avaliadas cinco repetições biológicas



4.7 Expressão diferencial de genes de síntese e sinalização de auxina e citocinina na interação Micro-Tom x *M. perniciosa* biótipo-S

Os resultados apresentados até o momento sugerem que a citocinina e a auxina possuem um papel no desenvolvimento dos sintomas. Nesse sentido, inicialmente, foi avaliado a expressão gênica relativa de alguns genes de biossíntese de citocinina e de resposta à sinalização por auxina que são, preferencialmente expressos no ápice caulinar e caule de acordo com uma análise realizada nas ferramentas *on-line* <http://gbf.toulouse.inra.fr/tomexpress> e <http://tomatolab.cshl.edu/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>. Posteriormente, foi sequenciado o transcriptoma da interação MT x *M. perniciosa* ao longo do desenvolvimento da infecção (12 h, 24 h, 48 h, 5 d, 10 d e 30 DAI) para avaliar a regulação transcricional dos genes relacionados a biossíntese e sinalização desses hormônios durante o reconhecimento do patógeno e patogênese. Além do MT, foi sequenciado também o transcriptoma da interação na linha transgênica com reduzidos níveis de citocinina, *35S::AtCKX2*.

Preliminarmente, os genes analisados associados à citocinina foram *Isopentenyltransferase (IPT3)* um dos genes participante da biossíntese de citocininas, e *Lonely guy (LOG1 e LOG5)*, que representa o gene de ativação de citocininas, que converte *isopentenyladenine (iP) ribosides* em nucleotídeos ativos (iP) (Figura 36). Em relação a auxina, foram analisados os genes *Indole-3-acetic acid/Aux (AUX/IAA1, AUX/IAA9 e AUX/IAA27)*, repressores do complexo proteico receptor de auxina SCF/TIR, *Auxin response factor (ARF2A, ARF2B, ARF4, ARF8 e ARF10)* fatores de transcrição que ativam a indução de genes de resposta à auxina e *Auxin-induced SAUR-like protein (SAUR4)* de resposta à sinalização por auxina (Figura 37). O padrão de expressão gênica foi analisado no ápice caulinar de MT inoculado em relação ao controle não inoculado em seis períodos de coleta (6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 96 h e 144 HAI).

Para analisar a expressão destes genes alvos, o fungo foi primeiramente detectado nas amostras inoculadas de forma a assegurar que houve infecção. O *M. perniciosa* pode ser detectado por meio de amplificação de transcritos reversos empregando genes específicos como *Actina* e *RpL35* (LEAL JUNIOR et al., 2007). Dessa forma, foi realizada a detecção de transcritos do gene *RpL35* de *M. perniciosa* nas amostras inoculadas a partir da curva de dissociação do produto amplificado (*melting*) por RT-qPCR específico, tendo como controle positivo o cDNA do fungo cultivado *in vitro*. A presença do fungo foi detectada em todos os períodos analisados (dados não mostrados).

Em relação à citocinina, o gene *IPT3*, um membro da família gênica que codifica a primeira enzima da via de biossíntese desse hormônio, foi induzido quase duas vezes mais no inoculado do que no controle em 6 HAI, e foi reprimido nas plantas inoculadas em relação ao controle aos 24 HAI (Figura 36). Na via de síntese de citocinina também foram avaliados dois genes da família *LOG*. O gene *LOG1* foi diferencialmente expresso apenas a 48 HAI, onde foi reprimido no inoculado em relação ao controle (Figura 36). Nos demais períodos não houve diferença significativa entre as amostras inoculadas em relação ao controle, apesar de ser induzido nos momentos finais da avaliação (96 e 144 HAI). De forma similar ao gene *IPT3*, o gene *LOG5* foi induzido quase duas vezes; no entanto, *LOG5* foi induzido em um momento posterior (96 HAI) ao *IPT3* e posteriormente, a 144 HAI foi reprimido (Figura 36). Sinalização diferencial por citocinina foi observada em 24 h e 36 HAI em vários tecidos da linha transgênica *ARR5::GUS* inoculada. Esses resultados sugerem que na fase de reconhecimento do *M. perniciosa* (6 h até 96 HAI), ocorre indução dos genes de biossíntese e resposta à citocinina. Em vassouras verdes no cacaueteiro analisadas por RNA-seq com

replicatas biológicas não foi observada indução de genes de síntese de citocinina (TEIXEIRA et al., 2014).

De modo geral, os três membros da família *AUX/IAA* apresentaram redução no acúmulo de transcritos nas amostras inoculadas em relação ao controle, exceto no período de 48 HAI, quando houve acúmulo de *AUX/IAA27* (Figura 37). Estes genes são, no geral, induzidos rapidamente pelo tratamento com auxina exógena (ABEL; THEOLOGIS, 1996; HAGEN; GUILFOYLE, 2001). Na presença de auxina, os complexos *SCF/TIR* ligam moléculas de ubiquitina às proteínas *AUX/IAA*, o que promove sua destruição pelo proteassomo 26S (MOUBAYIDIN et al., 2009; FU; WANG, 2011). A remoção e a degradação das proteínas *AUX/IAA* libera os ativadores transcricionais *ARF* e esses ligados aos elementos de resposta à auxina estimulam a transcrição de genes induzidos por auxina. Assim, o nível de auxina endógena parece aumentar aos 48 HAI, como demonstrado pela expressão de *DR5::GUS* (Figura 31) e pela expressão do gene *AUX/IAA27* (Figura 37), corroborando os valores estimados de auxina com altos níveis a 5 d, 10 d e 20 DAI no MT inoculado em relação ao controle (Figura 32).

Regulação gênica similar foi observada para os cinco membros da família *ARF*, em que, apenas o acúmulo de transcritos de *ARF2B* foi observado a 96 HAI, e os demais membros desta família gênica foram reprimidos em todos os períodos analisados (Figura 37).

O gene *SAUR4* associado à resposta por auxina foi induzido, assim como o *ARF2B*, apenas a 96 HAI (Figura 37). Estes genes de resposta à auxina se encontram na via de sinalização posterior ao *AUX/IAA*. Portanto, após a aparente elevação da resposta à auxina em 48 HAI, pelo aumento da expressão do *AUX/IAA*, que foram degradados, favorecendo a expressão de genes responsivos à auxina (*ARF* e *SAUR*) em 96 HAI.

Figura 36 – Expressão relativa de genes de síntese de citocinina na região meristemática do tomateiro ‘Micro-Tom’ inoculado com *Monioliophthora perniciosa* em relação ao controle não inoculado de cada período. A expressão gênica relativa foi calculada no programa REST utilizando os valores do C_Q determinado por RT-qPCR e normalizados pelos genes de referência *PPA2Acs* e *tubulin*. O ‘*’ indica significância estatística a $p < 0,05$ de acordo com o REST

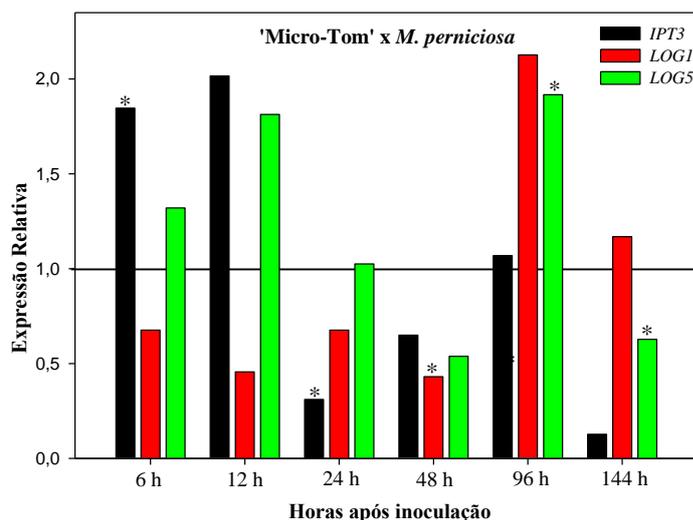
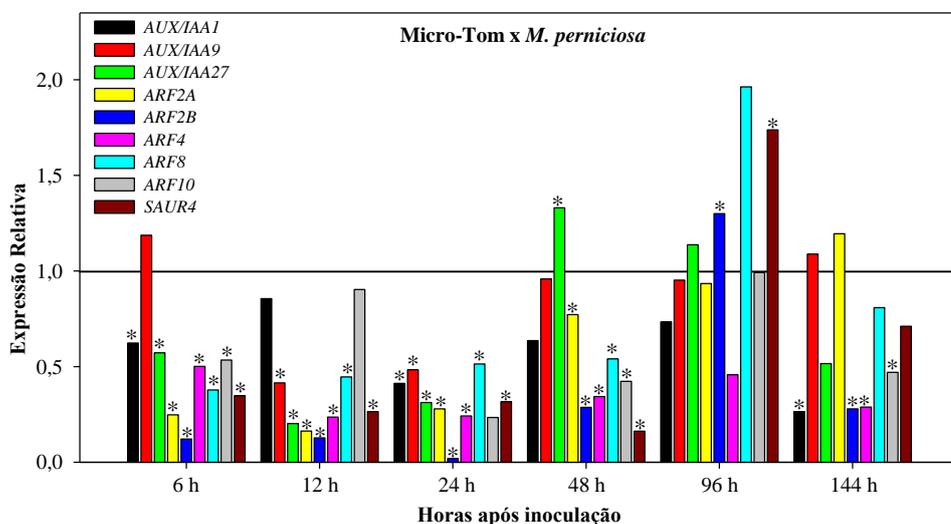


Figura 37 – Expressão relativa de genes associados a resposta à sinalização por auxina na região meristemática do tomateiro ‘Micro-Tom’ inoculado com *Monioliophthora perniciosa* em relação ao controle não inoculado de cada período. A expressão gênica relativa foi calculada no programa REST utilizando os valores do C_Q determinado por RT-qPCR e normalizados pelos genes de referência *PPA2Acs* e *tubulin*. O ‘*’ indica significância estatística a $p < 0,05$ de acordo com o REST

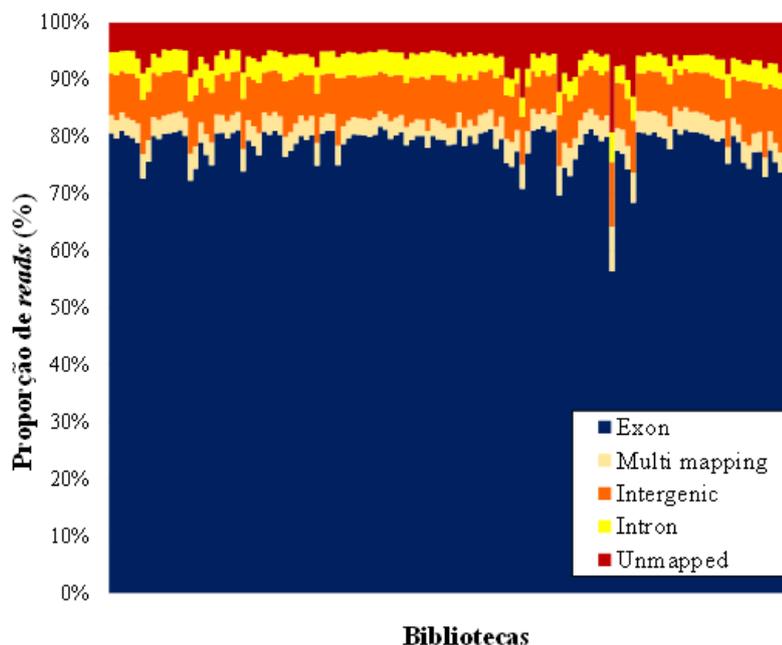


Cinco réplicas biológicas do ápice caulinar de MT e da linha transgênica *35S::AtCKX2* nos tempos 12 h, 24 h, 48 h, 5 d, 10 d e 30 DAI foram sequenciadas por RNA-seq para análise massal do transcriptoma, totalizando 120 bibliotecas. Os *reads* foram mapeados em 34.879 transcritos do genoma de referência de *S. lycopersicum* ITAG 3.1 (THE TOMATO GENOME CONSORTIUM, 2012). A variação na porcentagem de *reads* mapeados no genoma foi de 95,4 a 80,8 % (Figura 35), representados por *reads* mapeados em exons, introns, regiões intergênicas e sequências *multi mapping*. Do total, 15 bibliotecas (14 bibliotecas de MT controle de 12 HAI a 30 DAI e uma biblioteca de *35S::AtCKX2* controle 48 HAI) apresentaram mais que 95 % dos *reads* mapeados no genoma de referência (Figura 38), enquanto que, 100 bibliotecas apresentaram entre 95 % e 90 %, e apenas cinco bibliotecas (*35S::ATCKX2* inoculado de 12 h a 48 HAI) menos que 90 % de *reads* mapeados no genoma de referência (Figura 38). A biblioteca do genótipo *35S::AtCKX2* inoculado em 48 HAI obteve a menor porcentagem de *reads* mapeados no genoma de referência, sendo este valor de 80,8 % (Figura 38).

No patossistema *T. cacao* x *M. pernicioso*, Teixeira et al. (2014) obtiveram aproximadamente 80 % dos *reads* mapeados no genoma de referência do cacau, em que foram utilizados 34,997 transcritos de cacau. Na interação biotrófica de *S. lycopersicum* x *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, a análise do transcriptoma mostrou uma média de 95,88 % dos *reads* mapeados no genoma do tomateiro (YANG et al., 2015). Assim, através das elevadas porcentagens obtidas no mapeamento do transcriptoma da interação *S. lycopersicum* x *M. pernicioso* no genoma de referência do tomateiro é possível sugerir que os *reads* obtidos do sequenciamento apresentaram boa qualidade, o suficiente para serem mapeadas e reconhecidas no genoma de referência.

Os *reads* mapeados em exons foram utilizados para análise de expressão diferencial (DE). A biblioteca representada por MT controle 24 HAI apresentou a maior quantidade de *reads* mapeados em éxons, 10.746.696 *reads* (Figura 38). Já a biblioteca representada por *35S::AtCKX2* inoculado a 48 HAI teve a menor quantidade de *reads* mapeados em éxons, 676.073 *reads* (Figura 38). Apenas cinco bibliotecas apresentaram mais que 10 milhões de *reads* mapeados em exons, incluindo MT controle 12 e 24 h e *35S::AtCKX2* controle a 12 HAI. As outras 114 bibliotecas apresentaram mais de um milhão de *reads* mapeados em éxons (Figura 38).

Figura 38 – Representação da porcentagem de *reads* mapeados em éxons, múltiplas posições no genoma (*multi mapping*), região intergênica e íntron e de *reads* não mapeados para cada uma das 120 bibliotecas



A partir da obtenção dos valores de *read counts* foi conduzida a análise de expressão gênica diferencial (DE) utilizando um modelo linear generalizado (glm, *generalized linear model*) e desenho do tipo *one-way* para contrastar a resposta à infecção de cada um dos dois genótipos em cada ponto do tempo avaliado. Visando corroborar os dados obtidos em outros experimentos, os dados de RNAseq foram analisados focados especificamente em genes associados a síntese e sinalização por citocinina e auxina.

Nesse sentido, genes diferencialmente expressos relacionados à via de citocinina, como biossíntese - *IPT* (*Isopentenyltransferase*), ativação - *LOG* (*Cytokinin riboside 5'-monophosphate*), degradação de citocininas - *citokinin oxidase* (*CKX*), transporte de citocininas pela membrana - *Purine permease* (*PUP*) e *Equilibrative nucleoside transporter* (*ENT*), transdução de sinal - *Histidine kinase* e elementos de resposta *two-components* (*ARRs*), e de resposta à citocinina, *Cytokinin Response Factors* (*CRF*), induzidos e/ou reprimidos foram identificados em MT e na linha transgênica 35S::AtCKX2 inoculada em relação ao controle (Tabela 4).

Genes *IPT* (um gene) e *LOG* (dois genes) foram reprimidos em MT inoculado em relação ao controle aos 30 DAI (Tabela 4). Já na linha transgênica 35S::AtCKX2, *IPT* foi induzido em 48 HAI e *LOG* foram induzidos em 24 h, 48 h, 5 d e 30 DAI, mostrando que houve indução desses genes no genótipo com menor percentual de infecção, possivelmente

em resposta a superexpressão de uma citocinina oxidase que degrada citocinina, como forma de compensação da elevada degradação deste hormônio na linha transgênica *35S::AtCKX2*. Assim como no MT inoculado, em vassouras verdes de cacauero suscetível houve repressão de *IPT* (TEIXEIRA et al., 2014).

CKX, gene de degradação de citocininas, foi induzido no desenvolvimento dos sintomas, em 10 d e 30 DAI em MT (dois genes) e 30 DAI em *35S::AtCKX2* (dois genes), sendo que MT apresentou elevada indução em 30 DAI, com valor de *fold change* (FC) (inoculado x controle) de 63,6 (Tabela 4) e em *35S::AtCKX2* o maior FC foi de 7,6 no mesmo período (Tabela 4), o que demonstra que no genótipo suscetível houve acúmulo de transcritos de genes que atuam na degradação de citocininas. Esse resultado corrobora com Teixeira et al. (2014) que mostraram que houve aumento nos níveis de transcritos de *CKX* em vassouras verdes de cacauero. Melnick et al. (2012) reportaram elevada indução de *TcCKX5* e *TcCKX3* em almofadas florais infectadas por *M. pernicioso* nos genótipos suscetíveis de cacauero ('Comum', 'Joventina32' e 'NO-55'), as quais desenvolveram frutos partenocárpico, indicando que citocininas estão sendo degradadas no desenvolvimento da infecção do cacauero (MELNICK et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2014) e em tomateiro (Tabela 4).

Genes relacionados ao transporte de citocininas pela membrana, como *PUP* foram reprimidos nos tempos iniciais e induzidos em 30 DAI em MT. Já na linha transgênica *35S::AtCKX2*, o gene *PUP* foi induzido nas fases iniciais (12 h, 24 h, 48 HAI) da infecção por *M. pernicioso* e no desenvolvimento dos sintomas (10 d e 30 DAI) (Tabela 4). Outro transcrito associado ao transporte de citocininas pela membrana, *ENT* foi induzido no início da infecção por *M. pernicioso* (24 HAI) e reprimido no desenvolvimento dos sintomas (10 DAI) no MT. No genótipo menos suscetível *35S::AtCKX2*, *ENT* foi induzido em 24 HAI (Tabela 4).

Genes codificando elementos envolvidos na transdução de sinal por citocinina, como *Histidine kinase*, foram reprimidos em 24 h e 30 DAI em MT e, em 12 h, 24 h, 48 h e 30 DAI na linha transgênica *35S::AtCKX2*. Por outro lado, os genes que codificam os elementos de resposta *two-components* (*ARRs*) foram induzidos em 12 h, 10 d e 30 DAI no MT e 12 h, 48 h e 30 DAI na linha transgênica *35S::AtCKX2*, sendo que em MT houve maior indução (maior valor de FC foi de 18,3 em 30 DAI) do que em *35S::AtCKX2* (maior valor de FC foi de 8,6 em 12 HAI) (Tabela 4). *Cytokinin Response Factors* (*CRF*) também foram induzidos nos dois genótipos, com maior FC em *35S::AtCKX2* (Tabela 4).

Dessa forma, em MT inoculado houve indução de genes de biossíntese e de resposta à citocinina nas fases iniciais da patogênese do *M. perniciosa* de 6 h até 24 HAI, visto pela expressão gênica de *IPT3*, *ARR2-tipoA* e *CRF*, e pela sinalização diferencial de *ARR5::GUS* inoculado em 24 h e 36 HAI. Durante o desenvolvimento dos sintomas, a partir de 10 DAI houve indução de genes de degradação e resposta à citocinina e, aos 30 DAI, período representado pelo maior engrossamento do caule, há uma elevada indução de genes de degradação e resposta à citocinina comparado a linha transgênica *35S::AtCKX2* no mesmo período. Em cacaueteiro infectado por *M. perniciosa*, Orchard et al. (1994) mostraram que os níveis zeatina ribosídeo, um tipo de citocinina apresentou um aumento significativo nas plantas infectadas com o fungo.

Nesse sentido, os resultados apresentados do *screening* dos mutantes e linhas transgênicas, aplicação exógena de citocinina sintética, ensaio de localização histoquímica da sinalização induzida por citocinina e expressão diferencial de genes ao longo do progresso da infecção evidenciam a alteração no padrão de resposta à citocinina no tomateiro induzida pelo *M. perniciosa*, a qual tem um papel no engrossamento do caule (aumento dos tecidos vasculares), no aumento do número de lóculos dos frutos de plantas inoculadas de MT. Avaliando o fluido apoplástico de vassouras verdes de cacaueteiro, Barau et al. (2014) mostraram que há um acúmulo de hexoses em tecidos infectados e indução da expressão e atividade de invertases da parede celular. As invertases podem estar atuando na regulação das respostas aos hormônios citocinina e auxina durante a fase biotrófica da vassoura-de-bruxa (BARAU et al., 2014).

Tabela 4 – Genes diferencialmente expressos de tomateiro relacionados à síntese, degradação e sinalização por citocinina no MT inoculado x controle e na linha transgênica 35S::AtCKX2 inoculado x controle

Acesso	Citocinina - descrição do gene	"Micro-Tom" - FoldChange					
		12 h	24 h	48 h	5 d	10 d	30 d
Solyc09g064910.1	<i>Adenylate isopentenyltransferase</i>						-32.1
Solyc01g005680.3	<i>Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase</i>						-4.8
Solyc11g069570.2	<i>Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase</i>						-2.2
Solyc04g016430.3	<i>Cytokinin oxidase/dehydrogenase-like</i>					2.7	2.3
Solyc10g017990.2	<i>Cytokinin oxidase/dehydrogenase-like</i>						63.6
Solyc02g071080.2	<i>Purine permease</i>						2.5
Solyc03g005820.3	<i>Purine permease</i>		-2.4				
Solyc07g008200.3	<i>Equilibrative nucleoside transporter</i>		3.6			-2.6	
Solyc05g015610.3	<i>Histidine kinase CHK3</i>		-3.1				
Solyc07g047770.3	<i>Histidine kinase CHK2</i>		-2.2				
Solyc08g068960.3	<i>Histidine kinase 5</i>						-2.1
Solyc01g017560.2	<i>Response regulator 11</i>						-7.2
Solyc02g071220.3	<i>Type-A response regulator2</i>	2.5					3.2
Solyc03g113720.3	<i>Two-component response regulator</i>					2.1	3.4
Solyc05g006420.3	<i>Two-component response regulator</i>						3.0
Solyc06g048600.3	<i>Response regulator 7</i>						18.3
Solyc06g048930.3	<i>Response regulator 16,17</i>						8.1
Solyc07g061930.1	<i>Response regulator 14</i>	-2.4					
Solyc05g009450.2	<i>Cytokinin Response Factor 10</i>		2.9				
Solyc06g051840.1	<i>Cytokinin Response Factor 6</i>		2.6				
35S::AtCKX2 – FoldChange							
Solyc04g007240.1	<i>Adenylate isopentenyltransferase</i>			7.0			
Solyc01g005680.3	<i>Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase</i>		2.2	2.5			
Solyc06g075090.3	<i>Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase</i>			-5.0			5.3
Solyc08g062820.3	<i>Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase</i>		2.1		2.0		
Solyc10g082020.2	<i>Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase</i>		8.7				
Solyc10g084150.2	<i>Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase</i>				3.3		
Solyc11g069570.2	<i>Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase</i>		3.3		2.3		
Solyc01g088160.3	<i>Cytokinin oxidase2</i>						7.6
Solyc08g061930.3	<i>Cytokinin oxidase/dehydrogenase-like</i>		-2.8				1.7
Solyc02g071060.3	<i>Purine permease</i>						2.3
Solyc02g071080.2	<i>Purine permease</i>	3.8					
Solyc03g005820.3	<i>Purine permease</i>			3.9			
Solyc07g008440.3	<i>Purine permease</i>	3.2		3.2			
Solyc08g077380.3	<i>Purine permease</i>					3.5	
Solyc12g057100.2	<i>Purine permease</i>		3.4				
Solyc12g087870.2	<i>Purine permease</i>			3.0			
Solyc07g008200.3	<i>Equilibrative nucleoside transporter</i>		12.0				
Solyc01g098400.3	<i>Histidine-containing phosphotransfer protein, putative</i>	2.0	-2.1	3.0		2.8	
Solyc05g015610.3	<i>Histidine kinase CHK3</i>	-2.3	-8.3				

(continua)

Tabela 4 – Genes diferencialmente expressos de tomateiro relacionados à síntese, degradação e sinalização por citocinina no MT inoculado x controle e na linha transgênica 35S::AtCKX2 inoculado x controle

(conclusão)

Acesso	Citocinina - descrição do gene	35S::AtCKX2 - FoldChange					
		12 h	24 h	48 h	5 d	10 d	30 d
Solyc07g047770.3	<i>Histidine kinase CHK2</i>	-2.5	-3.5	-2.0			
Solyc08g068960.3	<i>Histidine kinase 5</i>						-2.1
Solyc02g071220.3	<i>Type-A response regulator2</i>	8.6					2.8
Solyc03g026250.2	<i>Two-component response regulator</i>		-2.4				
Solyc03g113720.3	<i>Two-component response regulator</i>	5.3			-2.2		
Solyc03g113720.3	<i>Two-component response regulator</i>						2.6
Solyc05g006420.3	<i>Two-component response regulator</i>						1.9
Solyc05g054390.3	<i>Two-component response regulator</i>		-2.1				2.1
Solyc06g048600.3	<i>Response regulator 7</i>			5.9			
Solyc07g005140.3	<i>Two-component response regulator</i>		2.0				
Solyc01g095500.3	<i>Cytokinin Response Factor 5</i>	2.9	2.5				
Solyc03g007460.2	<i>Cytokinin Response Factor 4</i>	3.2					
Solyc03g119580.1	<i>Cytokinin Response Factor 9</i>		14.3				
Solyc05g009450.2	<i>Cytokinin Response Factor 10</i>		3.3				
Solyc06g051840.1	<i>Cytokinin Response Factor 6</i>	2.6	3.7				2.0
Solyc08g081960.2	<i>Cytokinin Response Factor 2</i>	2.5					

Ao analisar os genes diferencialmente expressos relacionados ao hormônio auxina, os genes da via biossintética, *YUC* (*Flavin monooxygenase*), e de resposta à sinalização por auxina, *AUX/IAA*, *ARFs*, *SAUR* e *GH3* (*Auxin-inducible GRETCHEN HAGEN*) foram induzidos e/ou reprimidos em resposta à infecção no MT e na linha transgênica 35S::AtCKX2. O gene *TAR2* (*Tryptophan aminotransferase related 2*), um dos genes participante da biossíntese de auxina foi diferencialmente expresso apenas para o genótipo 35S::AtCKX2 (Tabela 5).

TAR2 foi induzido em 24 h, 10 d e 30 DAI e reprimido em 48 HAI e, genes da família *YUC* (*Flavin monooxygenase*) foram induzidos 24 h, 48 h e 30 DAI, sendo altamente induzido em 24 HAI (FC de 90,0) (Tabela 5) na linha transgênica 35S::AtCKX2. Já em MT, genes de biossíntese de auxina como *YUC* foram reprimidos em 12 HAI (Tabela 5). Na presença de auxina, ocorre degradação de proteínas *AUX/IAA* e indução de fatores de transcrição e de genes de resposta à auxina (MOUBAYIDIN et al., 2009, FU; WANG, 2011). MT apresentou indução de genes da família de *AUX/IAA* nas fases de reconhecimento do *M. perniciosa* e no desenvolvimento dos sintomas em 12 h, 24 h e 30 DAI (Tabela 5). Já os *ARFs* foram reprimidos em 12 h e 48 HAI (Tabela 5) no MT. Na linha transgênica

35S::*AtCKX2* os genes *AUX/IAA* regulados por auxina foram induzidos nas fases iniciais da patogênese em 12 h, 24 h e 48 HAI (Tabela 5). Cerca de 12 genes relacionados à família dos *ARFs* foram diferencialmente expressos na linha transgênica 35S::*AtCKX2*, mas assim como MT foram reprimidos, apenas *ARF16A* foi induzido em 5 DAI (Tabela 5).

Os genes de resposta à sinalização por auxina como *SAUR* e *GH3* foram induzidos em resposta à infecção no MT em todos os tempos avaliados (Tabela 5). A linha transgênica 35S::*AtCKX2* também apresentou indução desses genes nas fases iniciais (12 h a 48 HAI) e no desenvolvimento do sintomas (10 d e 30 DAI). Contudo, em MT a intensidade da expressão desses genes foi mais intensa em 12 HAI e de 5 d a 30 DAI do que em 35S::*AtCKX2* (Tabela 5).

Nesse sentido, no MT houve indução de *AUX/IAA* regulados por auxina nas fases de reconhecimento do *M. perniciosa* de 12 h a 48 HAI, sinalização diferencial em *DR5::GUS* inoculado em 48 HAI e acúmulo de auxina em 5 d, 10 d e 20 DAI quando comparado ao seu controle. Os dados de quantificação de hormônios corroboram com a indução da expressão de genes de resposta à auxina no MT, como *SAUR* e *GH3* durante o progresso da infecção de 4 d a 30 DAI. Já na linha transgênica 35S::*AtCKX2* em resposta à infecção houve indução de genes de biossíntese e resposta à sinalização por auxina nas fases de reconhecimento do patógeno e de desenvolvimento dos sintomas, com maior acúmulo nos níveis de auxina nos períodos de 5 e 10 DAI.

Corroborando com esses resultados, em que demonstram que a auxina atua no desenvolvimento dos sintomas, Gesteira et al. (2007) identificaram a indução de genes de resposta à auxina na variedade Catongo, suscetível à vassoura-de-bruxa. Na mesma variedade de cacauero, Da Hora Jr et al. (2012) observaram um aumento progressivo na expressão dos genes de resposta à auxina nos estágios iniciais do desenvolvimento dos sintomas até 60 DAI. Em cacauero suscetível, genes de resposta à auxina, como *AUX/IAA*, *SAUR* e *GH3* foram induzidos em plantas infectadas pelo *M. perniciosa* biótipo-C no estágio biotrófico do ciclo de vida do patógeno (TEIXEIRA et al., 2014).

Em suma, os resultados obtidos mostraram que existe uma sinalização por auxina no reconhecimento do patógeno e de forma mais intensa no progresso da infecção durante o desenvolvimento dos sintomas em 5 d, 10 d, 20 d e 30 DAI, resultando na maior proliferação de células que compõe o xilema e floema, o que representa o engrossamento do caule. Portanto, sugere-se que existe um desbalanço citocinina/auxina no tomateiro cv. MT após a infecção pelo biótipo-S do *M. perniciosa* e que esses hormônios têm um papel no desenvolvimento dos sintomas (patogênese) nesse hospedeiro.

Tabela 5 – Genes diferencialmente expressos de tomateiro relacionados à síntese e sinalização por auxina no MT inoculado x controle e na linha transgênica 35S::AtCKX2 inoculado x controle

Acesso	Auxina - descrição do gene	"Micro-Tom" - FoldChange					
		12 h	24 h	48 h	5 d	10 d	30 d
Solyc01g112120.3	<i>Flavin-containing monooxygenase</i>	-3.5					
Solyc01g112130.3	<i>Flavin-containing monooxygenase</i>	-2.9					
Solyc03g120500.3	<i>Auxin-regulated IAA27</i>		-2.2				
Solyc03g121060.3	<i>Auxin-regulated IAA26</i>						-2.1
Solyc06g053840.3	<i>Auxin-regulated IAA4</i>		-2.5				2.2
Solyc06g066020.3	<i>Auxin-regulated IAA36</i>						2.8
Solyc06g084070.3	<i>Auxin-regulated IAA2</i>		2.6				
Solyc08g021820.3	<i>Auxin-regulated IAA29</i>						3.6
Solyc09g065850.3	<i>Auxin-regulated IAA3</i>	2.2					
Solyc09g083280.3	<i>Auxin-regulated IAA1</i>	2.1	2.5				
Solyc12g096980.2	<i>Auxin-regulated IAA11</i>	2.3					3.2
Solyc01g096070.3	<i>Auxin Response Factor 18</i>			-1.5			
Solyc01g103050.3	<i>Auxin Response Factor 1</i>			-1.3			
Solyc02g037530.3	<i>Auxin response factor 8B</i>	-2.3		-2.0			
Solyc02g077560.3	<i>Auxin response factor 3</i>			-1.6			
Solyc03g118290.3	<i>Auxin response factor 2A</i>			-1.5			
Solyc05g047460.3	<i>Auxin Response Factor 7B</i>	-2.1		-1.8			
Solyc07g016180.3	<i>Auxin Response Factor 7A</i>			-1.8			
Solyc07g042260.3	<i>Auxin Response Factor 7</i>	-3.1		-2.0			
Solyc07g043620.3	<i>Auxin Response Factor 6B</i>			-1.5			
Solyc08g008380.3	<i>Auxin Response Factor 9B</i>			-1.8			
Solyc11g069500.2	<i>Auxin Response Factor 10A</i>			-1.4			
Solyc12g006340.2	<i>Auxin Response Factor 6</i>			-1.9			
Solyc12g042070.2	<i>Auxin Response Factor 2B</i>	-2.4					
Solyc01g110670.3	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>	-3.2					
Solyc01g110780.1	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>				7.4		
Solyc01g110913.1	<i>Auxin responsive SAUR protein</i>				2.9		
Solyc01g110940.3	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>	2.4					
Solyc02g084005.1	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>		9.1				-2.4
Solyc03g033590.1	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>	8.1	5.2	9.9			
Solyc08g077020.1	<i>Auxin responsive SAUR protein</i>				3.2		
Solyc08g079150.1	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>		2.6				
Solyc10g084023.1	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>				16.7		
Solyc12g036415.1	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>	16.2	23.3	27.6			
Solyc10g018340.1	<i>Small auxin up-regulated RNA71 (SAUR)</i>	85.2					185.1
Solyc07g053030.3	<i>GH3 family protein</i>					3.3	
Solyc08g068490.3	<i>Auxin-responsive GH3 family protein</i>	-2.6					
Solyc10g006610.3	<i>Auxin-responsive GH3 family protein</i>						4.0
35S::AtCKX2 - FoldChange							
Solyc03g112460.3	<i>Tryptophan aminotransferase related 2, putative</i>		3.6	-4.0			4.2

(continua)

Tabela 5 – Genes diferencialmente expressos de tomateiro relacionados à síntese e sinalização por auxina no MT inoculado x controle e na linha transgênica 35S::AtCKX2 inoculado x controle
(continuação)

Acesso	Auxina - descrição do gene	35S::AtCKX2 - FoldChange					
		12 h	24 h	48 h	5 d	10 d	30 d
Solyc05g031600.2	<i>Tryptophan aminotransferase related 2</i>					3.8	
Solyc06g008050.3	<i>Flavin-containing monooxygenase</i>						21.8
Solyc06g065630.3	<i>Flavin monooxygenase</i>			4.0			
Solyc06g083700.3	<i>Flavin-containing monooxygenase</i>		7.9				
Solyc07g042430.1	<i>Flavin-containing monooxygenase</i>		90.0				
Solyc03g120380.3	<i>Auxin-regulated IAA19</i>		3.8	-3.5			
Solyc06g008580.3	<i>Auxin-regulated IAA22</i>	4.0		-2.9		-3.0	
Solyc06g008590.3	<i>Auxin-regulated IAA17</i>			-3.8		-2.4	
Solyc06g053830.3	<i>Auxin-regulated IAA7</i>		-4.8	-2.7			
Solyc06g053840.3	<i>Auxin-regulated IAA4</i>		-3.8				
Solyc06g066020.3	<i>Auxin-regulated IAA36</i>	4.0	9.6				
Solyc06g084070.3	<i>Auxin-regulated IAA2</i>	3.4					
Solyc08g021820.3	<i>Auxin-regulated IAA29</i>	6.6		5.3			
Solyc09g083290.3	<i>Auxin-regulated IAA14</i>					-2.0	
Solyc12g096980.2	<i>Auxin-regulated IAA11</i>		6.6				
Solyc02g037530.3	<i>Auxin response Factor 8B</i>	-2.4		-2.1			
Solyc03g118290.3	<i>Auxin response Factor 2A</i>	-2.2	-2.6	-2.4			
Solyc05g047460.3	<i>Auxin Response Factor 7B</i>			-2.3			
Solyc06g075150.3	<i>Auxin Response Factor 10B</i>						-1.6
Solyc07g016180.3	<i>Auxin Response Factor 7A</i>	-2.5		-2.7			
Solyc07g042260.3	<i>Auxin Response Factor 7</i>	-3.7	-2.7	-3.0			
Solyc08g008380.3	<i>Auxin Response Factor 9B</i>	-2.2					
Solyc09g007810.3	<i>Auxin Response Factor 16A</i>				2.5		
Solyc11g069190.2	<i>Auxin response Factor 4</i>			-2.2			
Solyc11g069500.2	<i>Auxin Response Factor 10A</i>						-1.4
Solyc12g006340.2	<i>Auxin Response Factor 6</i>		-2.5				
Solyc12g042070.2	<i>Auxin Response Factor 2B</i>	-2.1	-6.6				
Solyc01g110660.3	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>			-4.0			2.6
Solyc01g110670.3	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>						2.8
Solyc01g110790.3	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>						34.7
Solyc01g110843.1	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>	6.4					
Solyc01g110913.1	<i>Auxin responsive SAUR protein</i>		4.6	4.0		3.2	
Solyc01g110917.1	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>	3.7					
Solyc01g110940.3	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>			-4.6			
Solyc01g110970.3	<i>Auxin responsive SAUR protein</i>			-3.3			
Solyc02g084005.1	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>	28.4					
Solyc03g033590.1	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>		50.7				
Solyc06g053290.1	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>			4.5			
Solyc08g077020.1	<i>Auxin responsive SAUR protein</i>						4.8
Solyc08g079150.1	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>	2.8	4.6	-3.4			

(continua)

Tabela 5 – Genes diferencialmente expressos de tomateiro relacionados à síntese e sinalização por auxina no MT inoculado x controle e na linha transgênica *35S::AtCKX2* inoculado x controle

(conclusão)

Acesso	Auxina - descrição do gene	<i>35S::AtCKX2</i> - FoldChange					
		12 h	24 h	48 h	5 d	10 d	30 d
Solyc10g084020.1	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>			7.3			6.9
Solyc12g036415.1	<i>SAUR-like auxin-responsive protein family</i>	37.3	25.3	90.2			
Solyc10g018340.1	<i>Small auxin up-regulated RNA71(SAUR)</i>						167.9
Solyc07g053030.3	<i>GH3 family protein</i>		9.94				
Solyc05g050280.3	<i>Auxin-responsive GH3 family protein</i>		2.68				
Solyc08g068490.3	<i>Auxin-responsive GH3 family protein</i>				-2.51		
Solyc10g006610.3	<i>Auxin-responsive GH3 family protein</i>	-6.2		-4.1			

4.8 Avaliação do número de lóculos de frutos nos mutantes com alterações de programas de meristema inoculados com o *M. perniciosa*

Os resultados obtidos sugerem que a infecção pelo *M. perniciosa* causa um aumento significativo no número de lóculos dos frutos do tomateiro cv. MT, e que poderia haver um efeito dos hormônios citocinina e auxina no aumento do número de lóculos dos frutos. Quatro mutantes (*fasciated*, *Mouse ears*, *ovate* e *Lanceolate*), que possuem alterações nos programas de meristema afetando no número de lóculos, foram analisados para investigar qual via estaria sendo regulada pelo patógeno para aumentar o número de lóculos nos frutos.

Maior amplitude da variação na distribuição da quantidade de lóculos entre todos os mutantes analisados foi observada no mutante *fasciated*, sendo que, no inoculado essa variação foi de 4 a 30 lóculos, e no controle, foi de 2 a 18 lóculos (Figura 39). O gene *FASCIATED* (membro da família de fatores de transcrição do tipo *YABBY*) foi mapeado no cromossomo 11 do genoma do tomateiro e a sua mutação resulta numa inversão de 294 kb com um dos *breakpoints* no primeiro intron de *YABBY2* formando uma mutação nula e está a 1kb *upstream* do gene *CLV3* (HUANG; VAN DER KNAAP, 2011; VAN DER KNAAP et al., 2014). O fenótipo do mutante é resultante da falta de expressão de *CLV3* e de mudanças na regulação de *WUS* (MUÑOS, et al., 2011). Citocininas também são conhecidas por afetar na regulação e induzir na expressão de *WUS* (LEIBFRIED et al., 2005). Este resultado mostra que a sinalização pelo patógeno parece ser independente ou posterior (*downstream*) a mutação no gene *FASCIATED* para aumentar o número de lóculos nos frutos do hospedeiro.

Como foi visto que a infecção por *M. perniciosa* induz a expressão de genes de síntese e resposta à citocinina, que por sua vez, induz a expressão de *WUS*, sugere-se que possivelmente esse seja o efeito no mutante *fasciated* no aumento do número de lóculos nos frutos de plantas inoculadas (de 4 a 30 lóculos).

O mutante *Mouse ears* é resultante de um evento de *splicing* que fusionou a maior parte da região 5' de uma fosfotransferase com o transcrito *TKn2* intacto, o que proporcionou o aumento da expressão do *TKn2* (PARNIS et al., 1997). Dentre os vários fenótipos observados neste mutante, destaca-se a ampliação da atividade meristemática produzindo folhas mais elaboradas além de modificações na estrutura floral (PARNIS et al., 1997). Essas modificações foram capazes de produzir estruturas vegetativas ectópicas no fruto de forma semelhante ao observado no transgênico superexpressando *TKn2* (JANSSEN et al., 1998). Nesse mutante foi possível observar uma menor amplitude da variação no número de lóculos nos frutos de plantas inoculadas (1 a 9 lóculos) comparado com o controle não inoculado (1 a 7 lóculos) (Figura 39). Contudo, observa-se uma tendência que a infecção pelo *M. perniciosa* aumenta a porcentagem de frutos com mais lóculos (Figura 39). Sendo assim, o efeito da inoculação parece ser independente ou agir *downstream* ao efeito da mutação. SHANI et al. (2010) reportaram que proteínas *TKn2* ativa a biossíntese de citocinina pela indução de *IPT*, e conseqüentemente, induz a expressão de *WUS*. Isso sugere que no mutante *mouse ears* inoculado, o aumento na biossíntese de citocinina pelo efeito da mutação somado ao aumento na biossíntese e sinalização por citocinina pelo efeito da infecção pode estar atuando na tendência observada para o aumento na porcentagem de frutos com mais lóculos.

No mutante *ovate* houve uma menor amplitude da variação na quantidade de lóculos em relação ao *fasciated*, sendo que, no controle a variação foi de 2 a 9 e, no inoculado de 2 a 14 (Figura 39). Isto sugere que, provavelmente, é independente ou com ação posterior a mutação no aumento do número de lóculos. O gene *OVATE* atua como regulador negativo, sendo expresso nos primeiros estágios do desenvolvimento floral e do fruto, representando uma classe de proteínas regulatórias importantes no desenvolvimento vegetal (LIU et al., 2002). Uma mutação de base nesse gene leva a formação de um *stop codon* no segundo exon, resultando na mudança do formato do fruto, de redondo para alongado ou em forma de pêra (LIU et al., 2002).

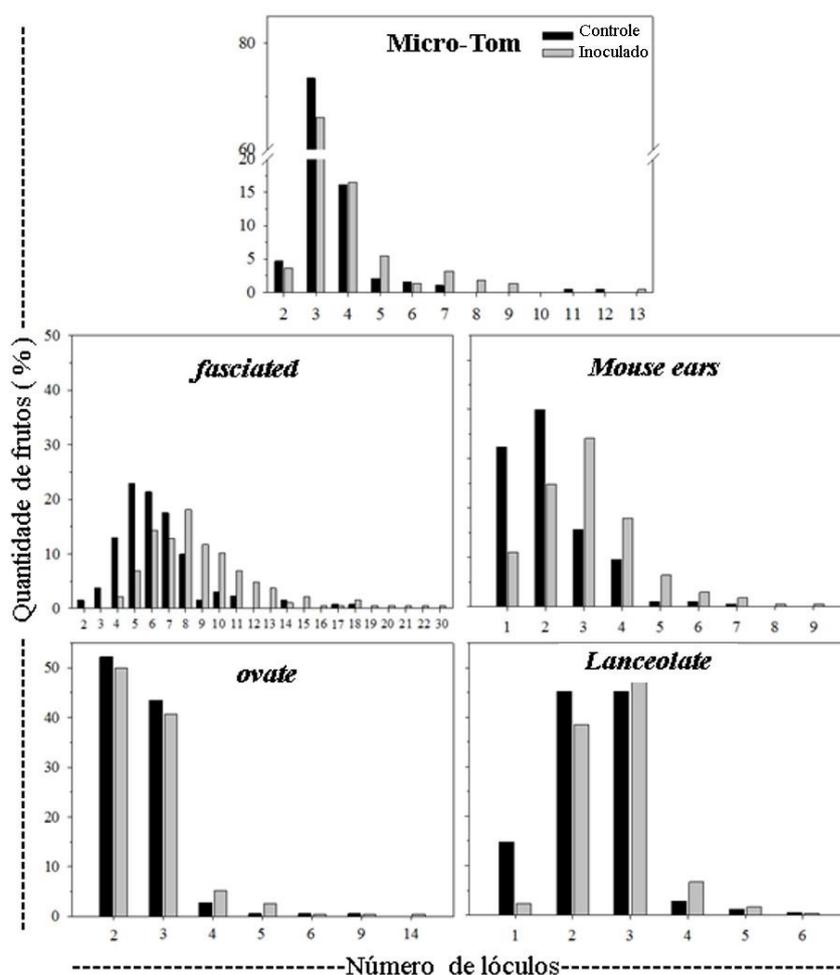
O mutante *Lanceolate* foi o que apresentou a menor amplitude na variação no número de lóculos, de 1 a 6, sendo que não houve variação entre inoculado e controle (Figura 39). A mutação dominante no alelo *Lanceolate* provoca uma desregulação na manutenção do meristema e, quando viável, pois essa mutação é dependente da dosagem alélica, leva a

conversão de folhas compostas em folhas pequenas, simples e com margem inteira e, a redução no número de lóculos nos frutos (ORI et al., 2007). O gene *LANCEOLATE* codifica o fator de transcrição do tipo TCP (*teosinte branched-cycloidea-proliferating cell factor*) que é regulado pelo miR319. Sendo assim, o fenótipo é resultante da reduzida sensibilidade do TCP pelo miR319 (ORI et al., 2007). Esse foi o único genótipo avaliado que possui alteração no programa de meristema que não foi observada a tendência do efeito da infecção pelo *M. pernicioso* em aumentar o número de lóculos nos frutos.

Os mutantes que apresentaram maior amplitude da variação na quantidade de lóculos foram os mesmos que apresentaram maior variação no número de sépalas e pétalas, variando de 5 a 15 sépalas e 5 a 18 pétalas (dados não mostrados). O mutante *fasciated* apresentou maior porcentagem de variação na distribuição da quantidade de lóculos, sépalas e pétalas, seguindo numa ordem decrescente dos mutantes *Mouse ears*, *ovate*, MT e *Lanceolate*. Em *Lanceolate* houve menor variação, 5 a 6 sépalas e pétalas, não diferindo o controle do inoculado.

Além da sinalização hormonal por citocinina atuar no meristema floral, aumentando o número de lóculos, os resultados sugerem que o gene relacionado à mutação *Lanceolate* parece estar envolvida de forma direta ou indireta na redução do efeito da infecção pelo *M. pernicioso* em aumentar o número de lóculos, visto que, a distribuição do número de lóculos neste mutante inoculado não difere do controle (não inoculado). O efeito da infecção pelo *M. pernicioso* em aumentar o número de lóculos nos frutos parece ser independente ou *downstream* a mutação *fasciated*, *Mouse ears* e *ovate*.

Figura 39 – Quantidade de lóculos nos frutos dos mutantes (*fasciated*, *ovate*, *Mouse ears* e *Lanceolate*) de tomateiro ‘Micro-Tom’ inoculado com *Moniliophthora perniciosa* biótipo-S e controle (não inoculado). Quantidade de frutos (%) correspondem as observações em porcentagem da quantidade de lóculos observada em relação ao total de frutos analisados por tratamento. Micro-Tom controle e inoculado, $n= 192$ e 218 frutos, respectivamente; *fasciated* controle e inoculado, $n= 131$ e 188 frutos, respectivamente; *Mouse ears* controle e inoculado, $n= 198$ e 173 frutos, respectivamente; *ovate* controle e inoculado, $n= 184$ e 194 frutos, respectivamente; e *Lanceolate* controle e inoculado, $n= 177$ e 255 frutos, respectivamente



Uma análise preliminar, sem repetições experimentais, mostrou que, além do tomateiro, o *M. perniciosa* parece a aumentar o número de lóculos em frutos de lobeira (*S. lycocarpum*) (Figura 40). Em uma das coletas de vassouras secas de lobeira em Tiradentes, MG, foram coletados frutos de plantas infectadas e de plantas visualmente saudáveis. Foram avaliados dez frutos de plantas infectadas e, destes 80% apresentaram quatro lóculos e 20% apresentaram três lóculos (Figura 40). Dos frutos avaliados oriundos de plantas visualmente

sadias, cinco frutos apresentaram dois lóculos e três frutos apresentaram três lóculos (Figura 40). Estes resultados, mesmo que preliminares, sugerem que a infecção com *M. pernicios* biótipo-S causa uma desregulação no desenvolvimento do meristema floral em solanáceas, visto que, as plantas infectadas tanto de tomateiro quanto de lobeira, apresentaram uma tendência de ter frutos com mais lóculos do que as plantas sadias.

De forma a explorar se o mesmo mecanismo ocorria em cacaueteiro, frutos infectados por *M. pernicios* biótipo-C foram analisados. Em cacaueteiro, o fruto é unilocular com placentação central (Figura 41A). Nos frutos jovens infectados foi observado que ocorre mudança na placentação, passando de central para lateral e são frutos uniloculares (Figura 41B). Nos frutos tipo ‘morango’ de cacaueteiro oriundos de flores infectadas não foi observada mudança na placentação e são uniloculares (Figura 41C). Sendo assim, é necessário avaliar um número maior de frutos jovens infectados e do tipo ‘morango’ para avaliar o efeito do patógeno no desenvolvimento floral de cacaueteiro.

Figura 40 – Frutos de lobeira (*Solanum lycocarpum*) coletados em Tiradentes, MG. A: fruto oriundo de planta ‘aparentemente’ sadia; B: fruto oriundo de planta infectada pelo *Monioliophthora pernicioso* biótipo-S. Barra: 1cm

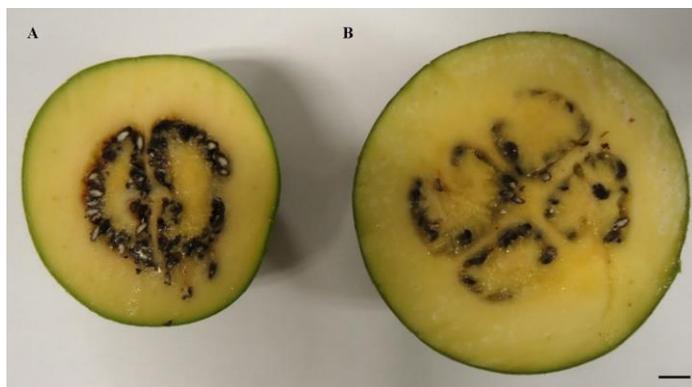


Figura 41 – Frutos de cacaueteiro coletados em Uruçuca, BA. A: fruto oriundo de planta sadia; B-C: fruto infectado pelo *Monioliophthora pernicioso* biótipo-C. Barra: 1cm



4.9 Clonagem do gene *IPT3* de tomateiro

A avaliação da linha transgênica *35S::AtCKX2* que superexpressa uma oxidase de citocinina, a qual degrada citocininas livres, possui baixos níveis endógenos de citocinina. Este genótipo inoculado apresentou reduzido percentual de infecção, menor engrossamento do caule e não apresentou aumento no número de lóculos. Além disso, o gene de tomateiro *IPT3* que atua na síntese de citocinina foi induzido nos momentos iniciais (6 HAI) na interação do MT com o *M. pernicioso*, por isso, este gene foi escolhido para clonagem e transformação do MT, pois nesse caso, espera-se um genótipo oposto ao *35S::AtCKX2* que apresente altos níveis de citocinina e com alta suscetibilidade ao *M. pernicioso*. Adicionalmente, essa linha

transgênica pode ser uma ferramenta para avaliarmos o efeito do excesso de citocinina na formação dos tecidos do caule. O produto no tamanho esperado (990 pb) foi amplificado a partir do cDNA do MT inoculado com *M. pernicioso* com 6 HAI e clonado no vetor de entrada do sistema *Gateway*. Após a confirmação da direção do inserto por sequenciamento e por digestão com *XbaI* e *XhoI*, foi realizada a recombinação com o vetor binário de destino pK7WG2D. Em seguida, o produto da recombinação foi clonado em *E. coli* e foi confirmada a inserção do gene de interesse por reação de digestão enzimática (*EcoRI*). A construção pK7WG2D::IPT3 foi então eletroporada na cepa GV3101 de *Agrobacterium* e a presença do inserto foi confirmada por PCR de colônia.

Os explantes cotiledonares de tomateiro cv. 'MT' foram então transformados em três experimentos independentes com 400 explantes por experimento. Entre os experimentos, o primeiro não gerou transformantes, mas no segundo e terceiro a eficiência de transformação foi de 0,5 % e 0,25 %, respectivamente. Os três regenerantes foram aclimatados e estão na fase de obtenção de sementes, sendo que a transgenia ainda não foi confirmada. A baixa eficiência de transformação genética de tomateiro pode ser devida a superexpressão do gene *IPT3*, visto que, este é o primeiro gene da via de síntese de citoninas. Sendo assim, será necessário otimizar as concentrações hormonais nos meios de cultivo a fim de obter mais eventos desta construção.

5 CONCLUSÕES

1. O isolado de *M. perniciosa* Tiradentes apresentou maior agressividade no tomateiro cv. MT comportando-se diferencialmente dos outros isolados produzidos no sistema *pie dish*, provocando uma maior incidência dos sintomas, maior engrossamento do caule (principal sintoma observado), redução da altura das plantas e maior distribuição da quantidade de lóculos nos frutos, sugerindo que basidiósporos produzidos em vassouras de lobeiras apresentam maior agressividade do que basidiósporos produzidos pelo fungo cultivado em meio artificial.

2. As classes hormonais citocinina e auxina parecem estar associadas na patogênese do biótipo-S em tomateiro, observadas por meio da redução dos sintomas na linha transgênica com reduzidos níveis de citocinina (*35S::AtCKX2*) e no mutante com baixa sensibilidade à auxina (*diageotropica*) e aumento dos sintomas no mutante com elevada sensibilidade à auxina (*entire*). A aplicação exógena de citocinina e auxina sintéticas fenocopiou sintomas similares aos encontrados em plantas infectadas como redução no crescimento, aumento do diâmetro do caule e no número de lóculos, fortalecendo a suposição que estes hormônios são responsáveis, particularmente citocininas no desenvolvimento dos sintomas provocados por *M. perniciosa* em tomateiro.

3. A quantificação da área de cada tecido do caule mostrou que o engrossamento do caule está associado à hipertrofia e hiperplasia das células que compõem o córtex e, principalmente o tecido vascular (xilema e floema). Por sua vez, a diferenciação e a proliferação das células do tecido vascular estão reconhecidamente associados aos hormônios auxina e citocinina, corroborando com os resultados da linha transgênica *35S::AtCKX2* que apresentou menores médias de áreas de xilema, floema e córtex, diferindo significativamente do MT e dos mutantes de percepção à auxina quando inoculados.

4. Existe sinalização diferencial, observada por meio do coramento histoquímico de *GUS*, em resposta à citocinina nas plantas inoculadas quando comparadas com as plantas controles em 24 HAI e 36 HAI e em resposta à auxina em 48 HAI, sugerindo que a infecção pelo *M. perniciosa* induziu uma sinalização inicial de citocinina, seguida de uma sinalização por auxina.

5. A infecção pelo *M. perniciosa* provoca um desbalanço hormonal observado através da mudança de níveis de diversos hormônios, com aumento de AJ, AS e auxina em MT durante o desenvolvimento dos sintomas, com maior incremento no início do desenvolvimento dos sintomas, aos 5 DAI e de ABA em 20 e 30 DAI, quando o caule de MT inoculado apresenta o inchamento. Contrariamente, a redução dos níveis de citocinina em *35S::AtCKX2* inoculado promoveu uma menor alteração no nível do hormônio auxina, observado pela redução dos níveis em 5 d e 20 DAI quando comparado com o MT inoculado, porém com um maior incremento de ABA aos 30 DAI que *diageotropica*, *entire* e MT. Aos 30 DAI houve maior incremento de AS em *diageotropica* inoculado do que nos demais genótipos, sendo que, o AS foi o único hormônio, dentre os analisados, detectado no micélio dicariótico do biótipo-S de *M. perniciosa*.

6. A infecção provocada por *M. perniciosa* induz genes de biossíntese e sinalização de citocinina e somente de resposta à auxina em MT, provavelmente para favorecer o estabelecimento do patógeno no hospedeiro, observado através do aumento na expressão desses genes nas fases iniciais da interação (de 6 h até 24 HAI) e durante o desenvolvimento dos sintomas, com elevada indução de genes de degradação e resposta à citocinina e auxina aos 30 DAI. Perfil de expressão diferente foi observado no genótipo *35S::AtCKX2* quando comparado ao MT, pois nesse caso houve maior indução de genes de biossíntese, transporte e resposta à citocinina até 48 HAI e de biossíntese e resposta à auxina nos momentos iniciais e durante a patogênese.

7. A infecção por *M. perniciosa* provoca um aumento no número de lóculos dos frutos de tomateiro, observado também em frutos de lobeira, evidenciando um efeito de citocinina na alteração do meristema floral. Além disso, a mutação *Lanceolate* parece estar envolvida de forma direta ou indireta na redução do efeito da infecção pelo *M. perniciosa* em aumentar o número de lóculos.

8. Portanto, os resultados obtidos sugerem que a infecção pelo biótipo-S do *M. perniciosa* em MT altere os níveis e sinalização dos hormônios vegetais, principalmente auxina e citocinina, provocando os sintomas da infecção, como o engrossamento do caule (proliferação das células do xilema, floema e córtex), redução no crescimento, redução na biomassa radicular e aumento no número de lóculos nos frutos.

REFERÊNCIAS

- ABEL, S.; THEOLOGIS, A. Early genes and auxin action. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, p. 9–17, 1996.
- 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**, Lancaster, v. 97, p. 1012-1022, 2005.
- ALBRECHT, T.; ARGUESO, C. T. Should I fight or should I grow now? The role of cytokinins in plant growth and immunity and in the growth–defence trade-off. **Annals of Botany**, Oxford, v. 119, n. 5, p. 725-735, 2017.
- ALONI, R. The induction of vascular tissue by auxin. In: DAVIES, P. J. **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action**. Dordrecht: Kluwer, 2004. p. 471–492.
- ALONI, R. The induction of vascular tissues by auxin and cytokinin. In: DAVIES, P. J. **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer, 1995. p. 531–546.
- ALVAREZ, J. C. **Efeito do desequilíbrio hormonal na supressão das respostas de defesa do cacauero durante as etapas iniciais da infecção pelo fungo *Moniliophthora perniciosa***. 2013. 203 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.
- ANDEBRHAN, T.; FIGUEIRA, A.; YAMADA, M. M.; CASCARDO, J.; FURTEK, D. B. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis perniciosa*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, p. 167-175, 1999.
- ANDEBRHAN, T.; HAMMERSTONE, J. F.; ROMANCZYK, L. J.; FURTEK, D. B. Sensitivity of *Crinipellis perniciosa* to procyanidins from *Theobroma cacao* L. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, p. 339-348, 1995.
- ARGUESO, C. T.; FERREIRA, F. J.; EPPLE, P.; TO, J. P.; HUTCHISON, C. E.; SCHALLER, G. E.; DANGL, J. L.; KIEBER, J. J. Two-component elements mediate interactions between cytokinin and salicylic acid in plant immunity. **Plos Genetics**, San Francisco, v. 8, e1002448, 2012.
- ARGUESO, C. T.; FERREIRA, F. J.; KIEBER, J. J. Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. **Plant, Cell & Environment**, New York, v. 32, p. 1147-1160, 2009.
- ARGUESO, C. T.; RAINES, J. J.; KIEBER, J. J. Cytokinin signaling and transcriptional networks. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 13, p. 533-539, 2010.

BARAU, J.; GRANDIS, A.; CARVALHO, V. M.; TEIXEIRA, G. S.; ZAPAROLI, G. H. A.; SCATOLIN DO RIO, M. A.; RINCONES, J.; BUCKERIDGE, M. S.; PEREIRA, G. A. G. Apoplastic and intracellular plant sugars regulate developmental transitions in witches' broom disease of cacao. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, p. 1325–1337, 2014.

BARCISZEWSKI, J.; SIBOSHA, G.; RATTAN, S. I. S.; CLARK, B. F. C. Occurrence, biosynthesis and properties of kinetin (N⁶-furfuryladenine). **Plant Growth Regulation**, Heidelberg, v. 32, p. 257-265, 2000.

BARRERO, L. S.; TANKSLEY, S. D. Evaluating the genetic basis of multiple-locule fruit in a broad cross section of tomato cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 109, p. 669-679, 2004.

BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis pernicios* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology**, Oxford, v. 34, p. 306–312, 1985.

BEHNKE, H. D. Phloem tissue and sieve elements in algae, mosses and ferns. In: ARONOFF, S.; DAINTY, J.; GORHAM, P. R.; SRIVASTAVA, L. M.; SWANSON, C. A. (Ed.). **Phloem transport**. Boston: Springer, 1975. p. 187-224. (NATO Advanced Study Institutes Series, 4).

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.

BESSEL, G. W.; MULLEN, R. T.; BEWLEY, J. D. *Procera* is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, p. 585-593, 2008.

BIELACH, A.; PODLEŠÁKOVÁ, K.; MARHAVÝ, P.; DUCLERCQ, J.; CUESTA, C.; MÜLLER, B.; GRUNEWALD, W.; TARKOWSKI, P.; BENKOVÁ, E. Spatio temporal regulation of lateral root organogenesis in *Arabidopsis* by cytokinin. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, p. 3967–3981, 2012.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, p. 2114-2120, 2014.

BRADING, P. A.; HAMMOND-KOSSACK, K. E.; PARR, A.; JONES, J. D. G. Salicylic acid is not required for Cf-2- and Cf-9-dependent resistance of tomato to *Cladosporium fulvum*. **Plant Journal**, Oxford, v. 23, p. 305-318, 2000.

CARVALHO, R. F.; CAMPOS, M. L.; PINO, L. E.; CRESTANA, S. L.; ZSOGON, A.; LIMA, J. E.; BENEDITO, V. A.; PERES, L. E. P. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: Micro-Tom as an effective toolkit for plant development research. **Plant Methods**, London, v. 7, n. 1, p. 18, 2011. doi: 10.1186/1746-4811-7-18.

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

CHANCLUD, E.; MOREL, J. B. Plant hormones: a fungal point of view. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 1289–1297, 2016.

CHAVES, F. C.; GIANFAGNA, T. J. Necrotrophic phase of *Moniliophthora perniciosa* causes salicylic acid accumulation in infected stems of cacao. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 69, p. 104-108, 2007.

CHEN, J. J.; JANSSEN, B. J.; WILLIAMS, A.; SINHA, N. A gene fusion at a Homeobox locus: alterations in leaf shape and implications for morphological evolution. **Plant Cell**, Rockville, v.9, p. 1289-1304, 1997.

CHOI, J.; HUH, S. U.; KOJIMA, M.; SAKAKIBARA, H.; PAEK, K.-H.; HWANG, I. The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 19, p. 284–95, 2010.

CONG, B.; BARRERO, L. S.; TANKSLEY, S. D. Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. **Nature Genetics**, New York, v. 40, p. 800-804, 2008.

DA HORA JUNIOR, B. T.; POLONI, J. F.; LOPES, M. A.; DIAS, C. V.; GRAMACHO, K. P.; SCHUSTER, I.; SABAU, X.; CASCARDO, J. C.; MAURO, S. M.; GESTEIRA, A. D. A. S.; BONATTO, D.; MICHELI, F. Transcriptomics and systems biology analysis in identification of specific pathways involved in cacao resistance and susceptibility to witches' broom disease. **Molecular Biosystems**, Cambridge, v. 8, p. 1507–1519, 2012.

DEGANELLO, J.; LEAL JUNIOR, G. A.; ROSSI, M. L.; PERES, L. E. P.; FIGUEIRA, A. Interaction of *Moniliophthora perniciosa* biotypes with Micro-Tom tomato: a model system to investigate the witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 63, p. 1251–1263, 2014.

DELLO LOIO, R.; NAKAMURA, K.; MOUBAYIDIN, L.; PERILLI, S.; TANIGUCHI, M.; MORITA, M. T.; AOYAMA, T.; COSTANTINO, P.; SABATINI, S. A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. **Science**, Washington, DC, v. 322, p.1380–1384, 2008.

DE SMET, I.; WHITE, P. J.; BENGOUGH, A. G.; DUPUY, L.; PARIZOT, B.; CASIMIRO, I.; HEIDSTRA, R.; LASKOWSKI, M.; LEPETIT, M.; HOCHHOLDINGER, F.; DRAYE, X.; ZHANG, H.; BROADLEY, M. R.; PÉRET, B.; HAMMOND, J. P.; FUKAKI, H.; MOONEY, S.; LYNCH, J. P.; NACRY, P.; SCHURR, U.; LAPLAZE, L.; BENFEY, P.; BEECKMAN, T.; BENNETT, M. Analyzing lateral root development: how to move forward. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, p. 15–20, 2012.

DE VLEESSCHAUWER, D.; YANG, Y.; CRUZ, C. V.; HOFTE, M. Abscisic acid induced resistance against the brown spot pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in rice involves MAP kinase-mediated repression of ethylene signaling. **Plant Physiology**, Rockville v. 152, p. 2036-2052, 2010.

FU, J.; WANG, S. Insights into auxin signaling in plant–pathogen interactions. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 2, p. 74, 2011. doi: 10.3389/fpls.2011.00074.

FUJINO, D. W.; BURGER, D. W.; YANG, S. F.; BRADFORD, K. J. Characterization of an ethylene overproducing mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cultivar VFN8). **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, p. 774-779, 1988.

GESTEIRA, A. S.; MICHELI, F.; CARELS, N.; DA SILVA, A. C.; GRAMACHO, K. P.; SCHUSTER, I.; MACÊDO, J. N.; PEREIRA, G. A.; CASCARDO, J. C. Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora perniciosa*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, p. 129–140, 2007.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis perniciosa* using a bran-vermiculite medium. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 99, p. 227-230, 1993.

HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. J. Auxin-responsive gene expression: Genes, promoters, and regulatory factors. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 49, p. 373-385, 2001.

HELARIUTTA, Y.; BHALERAO, R. Between xylem and phloem: the genetic control of cambial activity in plants. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 5, p. 1–8, 2003.

HINSCH, J.; VRABKA, J.; OESER, B.; NOVÁK, O.; GALUSZKA, P.; TUDZYNSKI, P. De novo biosynthesis of cytokinins in the biotrophic fungus *Claviceps purpurea*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 17, p. 2935–2951, 2015.

HUANG, Z.; VAN DER KNAAP, E. Tomato fruit weight 11.3 maps close to fasciated on the bottom of chromosome 11. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 123, p. 465–474, 2011.

JANSSEN, B. J.; LUND, L.; SINHA, N. Overexpression of a homeobox gene, LeT6, reveals indeterminate features in the tomato compound leaf. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, p. 771–786, 1998.

JIANG, C. J.; SHIMONO, M.; SUGANO, S.; KOJIMA, M.; YAZAWA, K.; YOSHIDA, R.; INOUE, H.; HAYASHI, N.; SAKAKIBARA, H.; TAKATSUJI, H. Abscisic acid interacts antagonistically with salicylic acid signaling pathway in rice – *Magnaporthe grisea* interaction. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 23, p. 791-798, 2010.

KAZAN, K.; LYONS, R. Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors. **Plant Cell**, Rockville, v. 26, n. 6, p. 2285-2309, 2014.

KILARU, A.; BAILEY, B. A.; HASENSTEIN, K. H. *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 274, p. 238-244, 2007.

KIM, D.; LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. **Nature Methods**, New York, v. 12, p. 357–360, 2015.

KRUPASAGAR, V.; SEQUEIRA, L. Auxina destruction by *Marasmius pernicius*. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 56, p. 390-397, 1969.

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

LEYSER, O.; DAY, S. Signal Transduction. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 2. ed. Chichester: Wiley Blackwell, 2015. p. 834-871.

LI, H.; QI, M.; SUN, M.; LIU, Y.; LIU, Y.; XU, T.; LI, Y.; LI, T. Tomato transcription factor SIWUS plays an important role in tomato flower and locule development. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, p. 457, 2017. doi: 10.3389/fpls.2017.00457.

LIAO, Y.; SMITH, G. K.; SHI, W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, n. 7, p. 923-930, 2014.

LITHOLDO JUNIOR, C. G.; LEAL JUNIOR, G. A.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; FIGUEIRA, A. Differential expression of jasmonate biosynthesis genes in cacao genotypes contrasting for resistance against *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 34, p. 1747-1759, 2015.

LIU, J. P.; VAN ECK, J.; CONG, B.; TANKSLEY, S. D. A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 99, p. 13302–13306, 2002.

LLORENTE, F.; MUSKETT, P.; SÁNCHEZ-VALLET, A.; LÓPEZ, G.; RAMOS, B.; SÁNCHEZ- RODRÍGUEZ, C.; JORDÁ, L.; PARKER, J.; MOLINA, A. Repression of the auxin response pathway increases *Arabidopsis* susceptibility to necrotrophic fungi. **Molecular Plant**, Oxford, v. 1, p. 496–509, 2008.

MARELLI, J. P.; MAXIMOVA, S. N.; GRAMACHO, K. P.; KANG, S.; GUILTINAN, M. J. Infection biology of *Moniliophthora perniciosa* on *Theobroma cacao* and alternate solanaceous hosts. **Tropical Plant Biology**, Berlin, v. 2, p. 149-160, 2009.

McGURL, B.; OROZCO-CARDENAS, M.; PEARCE, G.; RYAN, C. A. Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 91, p. 9799-9802, 1994.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **Plant Journal**, Oxford, v. 12, p. 1465-1472, 1997.

MELNICK, R. L.; MARELLI, J.-P.; SICHER, R. C.; STREM, M. D.; BAILEY, B. A. The interaction of *Theobroma cacao* and *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease, during parthenocarpy. **Tree Genetics and Genomes**, Heidelberg, v. 8, p. 1261–1279, 2012.

MILLS, L. J.; VAN STADEN, J. Extraction of cytokinins from maize, smut tumors of maize and *Ustilago maydis* cultures. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 13, p. 73-80, 1978.

MONDEGO, J. M. C.; CARAZZOLLE, M. F.; COSTA, G. G.; FORMIGHIERI, E. F.; PARIZZI, L. P.; RINCONES, J.; COTOMACCI, C.; CARRARO, D. M.; CUNHA, A. F.; CARRER, H.; VIDAL, R. O.; ESTRELA, R. C.; GARCÍA, O.; THOMAZELLA, D. P.; OLIVEIRA, B. V.; PIRES, A. B.; RIO, M. C.; ARAÚJO, M. R.; MORAES, M. H.; CASTRO, L. A.; GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, M. S.; NETO, J. P.; NETO, A. G.; BARBOSA, L. V.; GUILTINAN, M. J.; BAILEY, B. A.; MEINHARDT, L. W.; CASCARDO, J. C.; PEREIRA, G. A. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. **BMC Genomics**, London, v. 9, p. 548, 2008.

MORRISON, E. N.; EMERY, R. J. N.; SAVILLE, B. J. Phytohormone involvement in the *Ustilago maydis* – *Zea mays* pathosystem: relationships between abscisic acid and cytokinin levels and strain virulence in infected cob tissue. **Plos One**, San Francisco, v. 10, e0130945, 2015.

MOUBAYIDIN, L.; DI MAMBRO, R.; SABATINI, S. Cytokinin-auxin crosstalk. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 14, p. 557–562, 2009.

MUÑOS, S.; RANC, N.; BOTTON, E.; BERARD, A.; ROLLAND, S.; DUFFÉ, P.; CARRETERO, Y.; LE PASLIER, M. C.; DELALANDE, C.; BOUZAYEN, M.; BRUNEL, D.; CAUSSE, M. Increase in tomato locule number is controlled by two single-nucleotide polymorphisms located near WUSCHEL. **Plant Physiology**, Rockville, v. 156, p. 2244–2254, 2011.

NAVARRO, L.; BARI, R.; ACHARD, P.; LISON, P.; NEMRI, A.; HARBERD, N. P.; JONES, J. D. DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. **Current Biology**, London, v. 18, p. 650-655, 2008.

NISLER, J.; ZATLOUKAL, M.; POPA, I.; DOLEZAL, K.; STRNAD, M.; SPÍČHAL, L. Cytokinin receptor antagonists derived from 6-benzylaminopurine. **Phytochemistry**, London, v. 71, p. 823–830, 2010.

OH, K.; IVANCHENKO, M. G.; WHITE, T. J.; LOMAX, T. L. The diageotropica gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling. **Planta**, Berlin, v. 224, p. 133-144, 2006.

ORCHARD, J.; COLLIN, H. A.; HARDWICK, K.; ISAAC, S. Changes in morphology and measurement of cytokinin levels during the development of witches' broom on cocoa. **Plant Pathology**, Oxford, v. 43, p. 65-72, 1994.

ORCHARD, J.; HARDWICK, K. Photosynthesis, carbohydrate translocation and metabolism of host and fungal tissues in cacao seedlings infected with *Crinipellis pernicioso*. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 10, 1987. **Proceedings...** Santo Domingo, República Dominicana, 1987. p. 325-329.

ORI, N.; COHEN, A. R.; ETZIONI, A.; BRAND, A.; YANAI, O.; SHLEIZER, S.; MENDA, N.; AMSELLEM, Z.; EFRONI, I.; PEKKER, I.; ALVAREZ, J. P.; BLUM, E.; ZAMIR, D.; ESHED, Y. Regulation of *lanceolate* by mir319 is required for compound-leaf development in tomato. **Nature Genetics**, New York, v. 39, p. 787-791, 2007.

PARNIS, A.; COHEN, O.; GUTFINGER, T.; HAREVEN, D.; ZAMIR, D.; LIFSCHITZ, E. The dominant developmental mutants of tomato, *Mouse-ear* and *Curl*, are associated with distinct modes of abnormal transcriptional regulation of a knotted gene. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 2143-2158, 1997.

PATKAR, R. N.; NAQVI, N. I. Fungal manipulation of hormone-regulated plant defense. **Plos Pathogens**, San Francisco, v. 13, n. 6, e1006334, 2017.

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

PEREIRA, J. L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. M.; ALMEIDA, L. C. C. First record on the presence of witches' broom disease in the principal cocoa-producing area of Brazil. **Turrialba**, Turrialba, Costa Rica, v. 39, p. 459-461, 1989.

PERTRY, I.; VÁCLAVÍKOVÁ, K.; DEPUYDT, S.; GALUSZKA, P.; SPÍCHAL, L.; TEMMERMAN, W.; STES, E.; SCHMÜLLING, T.; KAKIMOTO, T.; VAN MONTAGU, M. C.; STRNAD, M.; HOLSTERS, M.; TARKOWSKI, P.; VEREECKE, D. Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 106, n. 3, p. 929-934, 2009.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFFLE, L. Relative Expression Software Tool (REST) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 30, n. 9, p. e36, 2002.

PIERRE, S.; GRIFFITH, G. W.; MORPHEW, R. M.; MUR, L. A. J.; SCOTT, I. M. Saprotrophic proteomes of biotypes of the witches' broom pathogen *Moniliophthora pernicioso*. **Fungal Biology**, Amsterdam, 2017. doi: 10.1016/j.funbio.2017.05.004.

PIETERSE, C. M.; VAN DER DOES, D.; ZAMIOUDIS, C., LEON-REYES, A.; VAN WEES, S. C. Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 28, p. 489–521, 2012.

PINO, L. E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M. S.; FARINHA, T. B.; BORGIO, L.; QUECINI, V., FIGUEIRA, A.; PERES, L. E. P. The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato Micro-Tom model system. **Plant Methods**, London, v. 6, p. 23, 2010. doi: 10.1186/1746-4811-6-23

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

ROBERT-SEILANIANTZ, A.; GRANT, M.; JONES, J. D. G. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, p. 317-343, 2011.

ROBERT-SEILANIANTZ, A.; NAVARRO, L.; BARI, R.; JONES, J. D. Pathological hormone imbalances. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 10, p. 372–79, 2007.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 132, p. 365-86, 2000.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics**. 4. ed. Cary, NC, 1996.

SANTNER, A.; ESTELLE, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. **Nature**, London, v. 459, p. 1071-1078, 2009.

SCARPARI, L. M.; MEINHARDT, L. W.; MAZZAFERA, P.; POMELLA, A. W. V.; SCHIAVINATO, M. A.; CASCARDO, J. C. M.; PEREIRA, G. A. G. Biochemical changes during the development of witches broom: The most important disease of cacao in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p. 865-877, 2005.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, New York, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.

SENA, K.; ALEMANNIO, L.; GRAMACHO, K. P. The infection process of *Moniliophthora perniciosa* in cacao. **Plant Pathology**, Oxford, v. 63, n. 6, p. 1272-1281, 2014.

SIDDIQUE, S.; RADAKOVIC, Z. S.; DE LA TORRE, C. M.; CHRONIS, D.; NOVÁK, O.; et al. A plant-parasitic nematode releases cytokinin that controls cell division and orchestrates feeding-site formation in host plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 122, p. 12669–12674, 2015.

SIEMENS, J.; KELLER, I.; SARX, J.; KUNZ, S.; SCHULLER, A.; NAGEL, W.; SCHMÜLLING, T.; PARNISKE, M.; LUDWIG-MÜLLER, J. Transcriptome analysis of *Arabidopsis* clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 19, p. 480–494, 2006.

SILVA, S. D. V. M. **Histologia e seleção de variáveis para avaliar resistência de cacauero a *Crinipellis pernicioso***. 1997. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

SPÍČHAL, L.; WERNER, T.; POPA, I.; RIEFLER, M.; SCHMÜLLING, T.; STRNAD, M. The purine derivative PI-55 blocks cytokinin action via receptor inhibition. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 276, p. 244–253, 2009.

TEIXEIRA, P. J. P. L.; THOMAZELLA, D. P. T.; REIS, O.; PRADO, P. F. V. do; DO RIO, M. C. S.; FIORIN, G. L.; JOSÉ, J.; COSTA, G. G. L.; NEGRI, V. A.; MONDEGO, J. M. C.; MIECZKOWSKI, P.; PEREIRA, G. A. G. High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora pernicioso*. **Plant Cell**, Rockville, v. 26, p. 4245–4269, 2014.

TEIXEIRA, P. J. P. L.; THOMAZELLA, D. P. T.; PEREIRA, G. A. Time for chocolate: current understanding and new perspectives on Cacao Witches' Broom Disease Research. **Plos Pathogens**, San Francisco, v. 11, n. 10, e1005130, 2015.

THE TOMATO GENOME CONSORTIUM. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature**, London, v. 485, p. 635–641, 2012.

ULMASOV, T.; MURFETT, J.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1963–1971, 1997.

VAN DER KNAAP, E.; CHAKRABARTI, M.; CHU, Y. H.; CLEVINGER, J. P.; ILLA-BERENGUER, E.; HUANG, Z.; KEYHANINEJAD, N.; MU, Q.; SUN, L.; WANG, Y.; WU, S. What lies beyond the eye: the molecular mechanisms regulating tomato fruit weight and shape. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 227, 2014. doi: 10.3389/fpls.2014.00227.

WALTERS, D. R.; MCROBERTS, N. Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? **Trends in Plant Sciences**, Oxford, v. 11, p. 581–586, 2006.

WIKINSON, J. Q.; LANAHAN, M. B.; YEN, H. C.; GIOVANNONI, J. J.; KLEE, H. J. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *Never-ripe*. **Science**, Washington, DC, v. 270, p. 1807–1809, 1995.

WU, Y.; ZHANG, D.; CHU, J. Y.; BOYLE, P.; WANG, Y.; BRINDLE, I. D.; DE LUCA, V.; DESPRÉS, C. The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. **Cell Reports**, Cambridge, v. 1, p. 639–644, 2012.

XU, C.; LIBERATORE, K. L.; MACALISTER, C. A.; HUANG, Z.; CHU, Y.-H.; JIANG, K.; BROOKS, C.; OGAWA-OHNISHI, M.; XIONG, G.; PAULY, M.; VAN ECK, J.; MATSUBAYASHI, Y.; VAN DER KNAAP, E.; LIPPMAN, Z. B. A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. **Nature Genetics**, New York, v. 47, p. 784–792, 2015.

YANG, Y. X.; WANG, M. M.; YIN, Y. L.; ONAC, E.; ZHOU, G. F.; PENG, S.; XIA, X.-J.; SHI, K.; YU, J.-Q.; ZHOU, Y.-H. RNA-seq analysis reveals the role of red light in resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in tomato plants. **BMC Genomics**, London, v.16, p.120, 2015. doi: 10.1186/s12864-015-1228-7.

ZHANG, J.; CHEN, R.; XIAO, J.; QIAN, C.; WANG, T.; LI, H.; OUYANG, B.; YE, Z. A single-base deletion mutation in SlIAA9 gene causes tomato (*Solanum lycopersicum*) entire mutant. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 120, p. 671-678, 2007.

ZHAO, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 49-64, 2010.