

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

DANIELE PASCHOAL

Análise metabolômica da interação
Moniliophthora perniciosa x Solanum lycopersicum

Piracicaba

2018

DANIELE PASCHOAL

Análise metabolômica da interação
Moniliophthora perniciosa* x *Solanum lycopersicum

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira

Piracicaba

2018

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

Paschoal, D.

Análise metabólica da interação *Moniliophthora perniciosa* x *Solanum lycopersicum* / Daniele Paschoal; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Piracicaba, 2018.

160 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – 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. Basidiomiceto 2. Bioquímica 3. Fisiologia vegetal 4. Fitopatologia 5. Fungos fitopatogênicos 6. Metabólitos 7. Tomate 8. Vassoura-de-bruxa I. Título

CDU 632.27 : 581.13

Elaborada por:

Marilia Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Aos meus pais, Roseli e Sergio e ao meu irmão Sergio, por me amarem e me apoiarem incondicionalmente e por todo o esforço que sempre fizeram para que eu realizasse meus sonhos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por minha vida.

Ao Professor Figueira pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela orientação e disponibilidade, apoio, confiança e pelos ensinamentos e aconselhamentos.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade de realização do Mestrado em Ciências.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 132376/2016-4) e à FAPESP (2016/10498-4) pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira e à Thayana Alves do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UFSCar, São Carlos, pela realização das análises de RMN. Obrigada Thayana pela disposição para as análises, pelos ensinamentos e pela gentileza e carinho com que sempre me recebeu em São Carlos.

À Prof. Dra. Camila Caldana e à Juliana Aricette do CTBE, CNPEM, Campinas, pelas análises de GC-TOF-MS. Obrigada Juliana por toda a ajuda, explicações e por me receber sempre muito bem em Campinas.

Ao Prof. Dr. Valdemar Tornisielo e ao Rodrigo Pimpinato do Laboratório de Ecotoxicologia do CENA, USP, Piracicaba, pelas análises de translocação de ^{14}C -glicose. Obrigada Rodrigo por todas as explicações e as inúmeras ajudas no decorrer das análises.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferraz, à Fábila Barbosa e ao Diogo Capelin do Laboratório de Estudos de Plantas sob Estresse, ESALQ, USP, Piracicaba, pela realização das análises fisiológicas e pelas discussões científicas.

Ao Prof. Dr. Lázaro Perez e ao Prof. Dr. Jorge Mondego pelas contribuições durante a participação na comissão julgadora do exame de qualificação. Obrigada Prof. Lázaro pela disponibilidade do material vegetal.

A todos os docentes do CENA e ESALQ que contribuíram para minha formação.

A todos os funcionários do CENA por toda a atenção e disponibilidade, e à bibliotecária Marília pela ajuda e correção da dissertação.

Aos meus amigos do grupo *Moniliophthora* do LAMP pela amizade e ajuda durante o trabalho: à Juliana por me ensinar tudo sobre *M. perniciosa*, por otimizar diversos experimentos, por ceder os dados de RNA-seq para a identificação de genes com respeito ao metabolismo, e pela ajuda sempre; ao Éder pela parceria, pelos ensinamentos de biologia molecular, por sempre me ajudar e pelas discussões científicas; ao Vitor pelas infinitas ajudas

no decorrer do trabalho e pelo interesse e dedicação durante o trabalho; à Dani Scotton por todas as ajudas e conselhos; e à Jamille, que considero do grupo por sempre ser solícita em ajudar, tirar dúvidas e contribuir com seus conhecimentos.

Aos amigos alunos e pós-docs do LAMP com quem convivi: Alessandra, Bruna Factor, Bruna Marques, Eduardo Bressan, Emily, Érica, Fernando, Flávia, Gabriel, Guilherme, Joni, Letícia, Lorena, Luciana, Melissa, Paulo, Rafael, Thaísa e Thiago e Vivian por toda a ajuda e pelo ótimo convívio. Em especial aos meus amigos Luis, pela amizade, conselhos, conversas e por todas as ajudas, e à Albânia e Rodolfo pelo convívio, amizade e por sempre me ajudarem.

Aos técnicos do LAMP Felipe, Wlamir e Paulo por toda a ajuda sempre.

À Tati, minha *roommate*, pelos dois anos de convívio, conversas, desabafos, amizade e confiança. Tudo isso foi fundamental durante a realização desse trabalho. À Isa pelos 8 meses de convívio e pela amizade.

Aos meus amigos Fábria e Diego pela amizade, companheirismo e por todas as discussões científicas com respeito a esse trabalho. Obrigada Fábria pelas correções sobre as partes de fisiologia desse trabalho.

As minhas amigas da família Rep. Gaia pela união, apoio, companheirismo, amizade e confiança desde que entrei na faculdade até os dias de hoje. A amizade de vocês foi e é essencial em todos os caminhos trilhados. Em especial à Certz (Gabi) que sempre me ensinou e me ajudou desde o início da minha iniciação científica até hoje.

A todos os meus amigos pelo apoio e amizade. Em especial à Bia e Nathalie que, embora não convivam comigo diariamente, sempre estão comigo e me apoiam em minhas escolhas.

A toda minha família, em especial à minha mãe Roseli, meu pai Sergio e meu irmão Sergio pelo amor incondicional que sempre me deu forças para seguir em frente, por todo o apoio e suporte em todos os momentos da minha vida.

A todos que de alguma maneira contribuíram com esse trabalho.

Muito obrigada!

*“We must believe in ourselves or no one else will believe in us;
we must match our aspirations with the competence, courage and determination to succeed.”*

Rosalyn Sussman Yalow

RESUMO

PASCHOAL, D. **Análise metabolômica da interação *Moniliophthora perniciosa* x *Solanum lycopersicum***. 2018. 160 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

A “vassoura-de-bruxa” é uma importante doença que acomete o cacaueteiro, limitando a produção de cacauete na América do Sul. O basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, agente etiológico da doença, apresenta estilo de vida hemibiotrófico, causando sintomas de inchamento e indução de brotações laterais nos ramos infectados. O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) cv. ‘Micro-Tom’ (MT) demonstrou ser um modelo genético adequado para o estudo da interação com o biótipo-S de *M. perniciosa*, exibindo sintomas característicos da infecção. Considerando-se a escassez de conhecimentos referentes aos mecanismos bioquímicos e fisiológicos da patogênese de *M. perniciosa*, este estudo visou investigar as alterações fisiológicas e metabólicas durante a infecção por *M. perniciosa* em MT. A infecção induziu sintomas de engrossamento de caule, clorose de folhas e redução de raízes e frutos em MT. Foram também observados a redução na taxa fotossintética, fechamento de estômatos, aumento na concentração intercelular de CO₂ e redução na transpiração em folhas, e aumento da condutância e condutividade hidráulica no caule de plantas infectadas. A análise de metabólitos revelou o aumento de valina e metionina e a redução de ácido glicólico e mio-inositol-1 fosfato no início da infecção (4 dias após a infecção - DAI), enquanto que aos 10 DAI, foi detectada a diminuição de metabólitos associados à respiração e repressão de genes associados à fotossíntese e à biossíntese de amido. Aos 20 DAI, o aumento no metabolismo respiratório, a redução de sacarose e o aumento de frutose e poliaminas, e a indução de genes de degradação, transporte e sinalização de açúcares demonstrou uma alta demanda de energia e a realocação de carbono na região de infecção, sugerindo a formação de possível dreno. O aumento na translocação de ¹⁴C glicose para a região sintomática de MT infectado não foi observado nas linhas transgênicas 35S::*AtCKX2*, com baixos níveis de citocinina, enquanto que a aplicação de benzil-adenina aumentou a translocação de ¹⁴C glicose, sugerindo um papel da citocinina à formação de dreno em MT. A indução da via de fenilpropanóides e a provável produção de ascorbato indicam a produção de compostos antimicrobianos na tentativa de contenção da infecção. No entanto, aparentemente, a formação de flavonóides e ácido clorogênico é limitada. Além disso, o aumento na lignina poderia funcionar como nutriente para *M. perniciosa* na fase necrotrófica.

A oxidação de prolina, poliaminas e ascorbato exibe um ambiente de estresse oxidativo na região de sintomas, enquanto que o aumento de rafinose e GABA sugere a neutralização de ROS, amenizando seu efeito prejudicial. Aos 30 DAI, a realocação de carbono e as vias de sinalização de açúcares foram alteradas. A aplicação de sacarose em plantas infectadas reduziu os sintomas de engrossamento do caule. A infecção do mutante *single-flower truss* e do seu oposto *35S::SFT* demonstrou que *M. perniciosus* não afeta a transição do meristema vegetativo para reprodutivo, mas atrasa o desenvolvimento de flores. Por fim, a infecção dos mutantes para senescência *lutescent* e *green flesh* não alterou sintomas, nem permitiu a observação de necrose do tecido infectado. Um modelo bioquímico e fisiológico para infecção por *M. perniciosus* em MT foi proposto.

Palavras-chave: Vassoura-de-bruxa. Fisiologia. Metabólitos.

ABSTRACT

PASCHOAL, D. Metabolomic analysis of *Moniliophthora perniciosa* x *Solanum lycopersicum* interaction. 2018. 160 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

Witches' broom is a major disease of cacao, limiting cocoa production in South America. The basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the disease causative agent, presents hemibiotrophic lifestyle with an extensive biotrophic period, promoting typical symptoms of hypertrophic growth of stems and proliferation of axillary shoots. The tomato (*Solanum lycopersicum*) cv. 'Micro-Tom' (MT) is a suitable genetic model to study pathogenic interaction of S-biotype *M. perniciosa*, exhibiting typical symptoms of the infection. Considering the lack of knowledge regarding biochemical and physiological mechanisms of *M. perniciosa* pathogenesis, this study aimed to investigate physiological and metabolic changes during MT infection of *M. perniciosa*. Inoculation of *M. perniciosa* caused stem thickening, leaf chlorosis and reduction in root growth and fruits in MT. We also observed a decline in photosynthetic rate (A), stomatal closure, increase in intracellular CO₂, decrease in leaf transpiration and an increase on stem hydraulic conductance and conductivity in MT infected plants. Analysis of metabolites revealed an increase of methionine and valine content and a decrease in glycolic acid and mio-inositol-1-phosphate content at the beginning of MT infection (4 day after inoculation – DAI), whereas at 10 DAI, a decrease in metabolites associated with cell respiration, and downregulation of genes related to photosynthesis and starch biosynthesis was detected. At 20 DAI, an increase in respiratory metabolism, decrease in sucrose content and the accumulation of fructose and polyamines, and upregulation of genes related to sugar breakdown, transport, and signaling demonstrated high energy demand and carbon reallocation to infected stem, suggesting a possible sink formation. Major translocation of ¹⁴C glucose towards symptomatic MT stem infected was not observed in infected transgenic lines 35S::*AtCKX2*, with low levels of cytokinin, whereas benzyl-adenine application increased ¹⁴C-glucose translocation, suggesting a presumable role of cytokinin on inducing metabolic sink in MT. Upregulation of the phenylpropanoid pathway and the probable production of ascorbate suggest the production of antimicrobial compounds by the host in an attempt to contain the infection. However, apparently, the formation of flavonoids and chlorogenic acid is limited. Additionally, the increase in lignin could function as a nutrient for *M. perniciosa* consumption in the necrotrophic phase of infection.

Proline, polyamines, and ascorbate oxidation exhibits an oxidative stress environment at the site of MT infection, whereas the accumulation of raffinose and GABA suggests ROS neutralization, mitigating its harmful effects. At 30 DAI, carbon reallocation and sugar signaling pathways were shifted. Sucrose exogenous application in MT infected plants by *M. perniciosa* reduced symptoms of stem swelling, but did not reduce root growth or number of fruits. Inoculation of *single-flower truss sft* mutant and its opposite *35S::SFT* with *M. perniciosa* demonstrated that pathogen infection did not affect transition from vegetative to reproductive meristem, but decreased the development of flowers. Finally, inoculation of *lutescent* and *green flesh* senescence mutants neither altered symptoms of infection, nor enabled the observation of necrosis of infected tissue in MT background, as observed in cacao infected by *M. perniciosa*. A model for biochemical and physiological changes during MT infection by *M. perniciosa* was proposed.

Keywords: Witches' broom. Physiology. Metabolites.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 A interação <i>M. pernicioso</i> x <i>T. cacao</i>	18
2.2 Alterações metabólicas após a infecção por patógenos biotróficos e hemibiotróficos em plantas.....	20
2.3 Alterações bioquímicas decorrentes da infecção por <i>M. pernicioso</i>	25
2.4 Alterações hormonais decorrentes da infecção por <i>M. pernicioso</i>	26
2.5 Transição da fase biotrófica para necrotrófica na interação <i>M. pernicioso</i> x <i>T. cacao</i>	29
2.6 Utilização de MT como planta modelo nos estudos de infecção por <i>M. pernicioso</i>	31
2.7 O estudo da metabolômica	32
2.8 Dinâmica de trocas gasosas e do transporte de água em plantas.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Material vegetal	35
3.2 Produção de basidiósporos de <i>M. pernicioso</i> biótipo-S	35
3.3 Preparo das mudas	36
3.4 Inoculação com <i>M. pernicioso</i> biótipo-S.....	36
3.5 Avaliação dos sintomas de plantas MT após inoculação com <i>M. pernicioso</i>	36
3.6 Cultivo de <i>M. pernicioso</i>	37
3.7 Extração de DNA.....	37
3.8 Análise de quantificação por qPCR.....	37
3.9 Análises de trocas gasosas.....	38
3.10 Análises de área foliar	38
3.11 Análises de potencial hídrico foliar	39
3.12 Análises de condutância e condutividade hidráulica do caule	39
3.13 Análises por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa com analisador por Tempo de Voo (GC-MS-TOF).....	41
3.14 Análises por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹ H-RMN)	42
3.15 Aplicação exógena de citocinina 6-benzil-adenina (BA)	43
3.16 Translocação de ¹⁴ C glicose	43
3.17 Tratamento com sacarose em plantas MT	44
3.18 Cortes histológicos	45
3.19 Desenho dos iniciadores	45

3.20 Extração de RNA	46
3.21 Análise da expressão de genes via RT-qPCR	47
3.22 Avaliação de mutantes de florescimento e senescência.....	47
4 RESULTADOS.....	49
4.1 Caracterização dos sintomas da inoculação com <i>M. perniciosa</i> em MT	49
4.2 Detecção de <i>M. perniciosa</i> em MT	53
4.3 Caracterização fisiológica da infecção de tomateiro MT por <i>M. perniciosa</i>	55
4.4 Alteração no metabolismo de plantas MT decorrente da infecção por <i>M. perniciosa</i> ..	60
4.5 Análise do RNA-seq relacionada à alteração do metabolismo plantas MT decorrente da infecção por <i>M. perniciosa</i>	71
4.6 Translocação de ¹⁴ C glicose em plantas MT infectadas por <i>M. perniciosa</i>	76
4.7 Aplicação de sacarose em plantas MT infectadas por <i>M. perniciosa</i>	81
4.8 Mutantes para senescência e florescimento em MT	91
5 DISCUSSÃO	100
5.1 A infecção por <i>M. perniciosa</i> promove o engrossamento do caule e redução de raízes de plantas MT.....	100
5.2 A infecção por <i>M. perniciosa</i> induz alterações fisiológicas em plantas MT	101
5.3 A infecção por <i>M. perniciosa</i> altera o metabolismo de plantas MT.....	106
5.3.1 Metabolismo de açúcares.....	106
5.3.2 Metabolismo de aminoácidos	114
5.3.3 Fotorrespiração.....	117
5.3.4 Metabolismo de poliaminas.....	118
5.3.5 Metabolismo de nucleotídeos	120
5.3.6 Metabolismo secundário e modificação de parede celular	121
5.4 A infecção por <i>M. perniciosa</i> atrasa o desenvolvimento de flores e reduz o número e a biomassa de frutos de MT	124
5.5 Proposta de modelo bioquímico e fisiológico para infecção por <i>M. perniciosa</i> em MT	125
5.6 Aplicação de açúcar reduz sintomas da infecção por <i>M. perniciosa</i> em MT	126
6 CONCLUSÕES	129
REFERÊNCIAS.....	131
ANEXOS	149

1 INTRODUÇÃO

A “vassoura-de-bruxa” (agente causal *Moniliophthora perniciosa*, Marasmiaceae) é uma importante enfermidade que acomete o cacauzeiro (*Theobroma cacao*), correspondendo a um dos fatores mais relevantes que limitam a produção de cacau na América do Sul (Griffith et al., 2003). No Brasil, a Bahia representa o estado com maior produção de cacau, sendo o cultivo dessa cultura sob a sombra da floresta tropical. No entanto, invasão das regiões produtoras do sul da Bahia por *M. perniciosa* em 1989, suscitou o colapso das lavouras cacauzeiras, com queda em até 90% na produção (Andebrhan et al., 1999). O impacto dessa devastação transformou o Brasil de país tipicamente exportador a importador de sementes de cacau, afetando a economia (FAO, 2016) e o ambiente, e prejudicando milhares de pequenos produtores de cacau.

O fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, agente etiológico da doença, apresenta estilo de vida hemibiotrófico, com duas fases de infecção distintas: biotrófica e necrotrófica. Geralmente, a infecção por fungos hemibiotróficos implica em uma fase biotrófica transiente e assintomática. No entanto, a infecção por *M. perniciosa* exibe uma fase biotrófica peculiarmente extensa, podendo durar até três meses, antes da transição para fase necrotrófica (Teixeira et al., 2014).

Os sintomas característicos da “vassoura-de-bruxa” na fase biotrófica incluem inchamento, hipertrofia de caule e pecíolos, perda de dominância apical, região de entrenós encurtadas e indução de brotações laterais nos ramos infectados, resultando nas chamadas “vassouras-verdes”. Essas características se distinguem morfológica e bioquimicamente dos sintomas decorrentes da fase necrotrófica (Evans, 1980; Scarpari et al., 2005), que são caracterizados pela morte do tecido celular, formando “vassouras-secas”. As perdas econômicas decorrentes do estabelecimento da “vassoura-de-bruxa” em cacauzeiro são resultado da perda de produtividade, sobretudo em consequência da infecção direta em frutos, mas também devido à remobilização de recursos energéticos para ramos infectados na fase biotrófica (Teixeira et al., 2014) e à debilitação geral das plantas. Os efeitos fisiológicos e produtivos da infecção ainda não foram estimados em cacauzeiro devido a dificuldades inerentes à biologia do cacauzeiro.

Além do cacauzeiro, *M. perniciosa* pode infectar uma variedade de hospedeiros, permitindo que seus isolados sejam classificados em três biótipos, C, L e S (Griffith & Hedger, 1994). O biótipo-C infecta de forma patogênica espécies de *Theobroma* e *Herrania*, enquanto o biótipo-S infecta espécies silvestres de solanáceas e o biótipo-L infecta lianas silvestres sem provocar sintomas. Quando inoculado, o biótipo-S pode colonizar o tomateiro, possibilitando a

utilização da cultivar ‘Micro-Tom’ (MT) para estudos na interação patogênica de *M. perniciosa* (Deganello et al., 2014). ‘Micro-Tom’ demonstrou ser um modelo genético adequado para o estudo da interação com *M. perniciosa*, exibindo os sintomas característicos de hipertrofia, hiperplasia e formação de vassouras (Deganello et al., 2014), além da cultivar apresentar características favoráveis, como o pequeno porte (8 cm), capacidade de produzir de três a quatro gerações por ano e disponibilidade de coleção de mutantes e linhas transgênicas introgrididas no *background* genético MT (Carvalho et al., 2011).

O estudo da patogenicidade de *M. perniciosa* é bastante relevante devido ao extenso período biotrófico de infecção por esse patógeno, por meio da colonização do apoplasto, por micélio desprovido de estruturas especializadas para nutrição (Teixeira et al., 2014). Apesar da colonização em baixas densidades dos tecidos infectados (Penman et al., 2000; Sena et al., 2014), a infecção pelos biótipos -C e -S de *M. perniciosa* promove a formação de sintomas notáveis, com alterações morfológicas, hormonais, fisiológicas e bioquímicas marcantes em cacauero (Purdy & Schmidt, 1996; Scarpari et al., 2005; Teixeira et al., 2014; Barau et al., 2014) e em MT (Costa, 2017), respectivamente.

Inicialmente, análises das alterações bioquímicas e fisiológicas resultantes da infecção por *M. perniciosa* revelaram altos níveis de açúcares como glicose, frutose e sacarose, alcaloides, taninos, etileno e glicerol em vassouras-verdes de cacauero (Scarpari et al., 2005). Por sua vez, a análise de RNA-seq da interação *M. perniciosa* x *T. cacao* estabeleceu um modelo molecular do patossistema, descrevendo uma reprogramação metabólica e fisiológica durante o estágio biotrófico da infecção, que levaria à privação de carbono, responsável pela ativação de um processo de senescência prematura como sinalização para necrose do tecido (Teixeira et al., 2014). Mais recentemente, a análise massal de transcritos por RNA-seq da interação *M. perniciosa* biótipo-S x MT demonstrou uma alteração na sinalização e nos níveis dos hormônios, sobretudo de auxina e citocinina, sendo responsáveis pelos sintomas de engrossamento do caule, por meio do aumento dos tecidos xilema, floema e córtex, e redução no crescimento e na biomassa radicular, e alteração na morfologia e aumento no número de lóculos nos frutos (Costa, 2017).

No entanto, considerando-se a escassez dos conhecimentos com respeito aos mecanismos bioquímicos e fisiológicos resultantes da patogênese de *M. pernicioso*, este estudo visou contribuir com os conhecimentos relacionados aos sintomas e as alterações fisiológicas e metabólicas durante a infecção por *M. pernicioso* em MT. Os objetivos desse trabalho são:

- ❖ Caracterizar e quantificar os sintomas morfológicos e produtivos da infecção por *M. pernicioso* biótipo-S em MT;
- ❖ Detectar a presença de *M. pernicioso* biótipo-S por meio da amplificação específica da região *ITS* em órgãos de plantas MT infectadas visando demonstrar ou não a presença de micélio em regiões assintomáticas da planta infectada;
- ❖ Avaliar alterações fisiológicas, como trocas gasosas, potencial hídrico foliar e condutância e condutividade hidráulica do caule de plantas MT após a infecção por *M. pernicioso* biótipo-S;
- ❖ Detectar e quantificar metabólitos alterados após a infecção por *M. pernicioso* biótipo-S em MT no tempo, em comparação com plantas não infectadas, por meio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa com analisador por Tempo de Voo (GC-TOF-MS);
- ❖ Identificar genes diferencialmente expressos associados a alterações metabólicas após a infecção por *M. pernicioso* biótipo-S por meio de análise de RNA-seq de plantas MT infectadas em relação a não infectadas durante o progresso da infecção;
- ❖ Analisar a translocação de ^{14}C glicose em órgãos de plantas MT infectadas ou não por *M. pernicioso* biótipo-S, plantas 35S::*CKX2* infectadas ou não, e plantas MT tratadas ou não com benziladenina (BA) de forma a elucidar o papel da infecção e/ou citocininas na formação de dreno;
- ❖ Avaliar o papel da aplicação de sacarose em plantas MT infectadas ou não por *M. pernicioso* biótipo-S por análise de sintomas, histologia, expressão de genes associados ao metabolismo de açúcar e potencial hídrico foliar;
- ❖ Avaliar o papel da infecção por *M. pernicioso* biótipo-S na transição floral e na senescência empregando os mutantes *lutescent* ou *green flesh*, e *sft* ou linha transgênica 35S::*SFT* contrastantes para indução floral ou senescência, respectivamente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A interação *M. perniciosa* x *T. cacao*

Moniliophthora perniciosa (Aime & Phillips-Mora, 2005) [syn. *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer; Marasmiaceae *sensu lato*] é um fungo basidiomiceto da ordem Agaricales endêmico da região Amazônica, que coevoluiu com seu hospedeiro (Purdy & Schimdt, 1996). Com exceção dos fungos patogênicos *M. perniciosa* e *Moniliophthora roreri*, outro importante patógeno do cacaueiro que infecta exclusivamente frutos, a grande maioria dos fungos pertencentes a essa família são saprotróficos (Aime & Phillips-Mora, 2005; Teixeira et al., 2015); isto é, se alimentam de matéria orgânica em decomposição.

Os fungos patogênicos podem apresentar três tipos de estratégias para infecção de hospedeiros, sendo classificados em biotróficos, necrotróficos ou hemibiotróficos. Os fungos necrotróficos causam a morte das células do hospedeiro para colonizar o tecido. Por sua vez, os fungos biotróficos e hemibiotróficos são capazes de invadir células vivas, usando seu metabolismo com o objetivo de crescer e se desenvolver; entretanto, os fungos hemibiotróficos matam as células do hospedeiro nos estágios finais da infecção (Hammond-Kosack & Jones, 1997). Geralmente, a infecção por fungos hemibiotróficos implica em uma fase biotrófica transiente e assintomática. *Moniliophthora perniciosa* é considerado um fungo com estilo de vida hemibiotrófico, apresentando duas fases de infecção distintas: biotrófica e necrotrófica. No entanto, sua infecção exibe uma fase biotrófica peculiarmente extensa, podendo durar até três meses, antes da transição para fase necrotrófica (Teixeira et al., 2014).

O ciclo de vida de *M. perniciosa* se inicia com a infecção pelos basidiósporos dos tecidos meristemáticos da planta, como lançamentos foliares, flores e frutos em desenvolvimento (Purdy & Schimdt, 1996). A penetração dos basidiósporos pode ocorrer de forma direta (Sena et al., 2014) e por estômatos ou pequenos ferimentos (Frias et al., 1991), dando origem aos tubos germinativos que formam hifas primárias, convolutas, largas (5 a 20 μm), mononucleadas e sem grampos de conexão ou estruturas especializadas. As hifas monocarióticas se instalam na região apoplástica dos ramos do hospedeiro, crescendo lentamente e em baixas densidades, e representam a fase biotrófica da infecção (Penman et al., 2000; Sena et al., 2014). De 4 a 8 semanas após a infecção, há a formação de hifas delgadas (1 a 3 μm) dicarióticas com grampos de conexão, que crescem e se proliferam intensamente. O gatilho que desencadeia esse processo de transição de hifas monocarióticas para dicarióticas e a necrose do tecido com a colonização e morte do tecido do hospedeiro permanecem elusivos. Com a morte do tecido, os brotamentos dos ramos secam,

formando as chamadas “vassouras-secas”, de onde é derivado o nome da doença. Frutos infectados também sofrem podridão seca. O ciclo se completa com a formação de basidiocarpos nos tecidos necrosados secos, com produção de basidiósporos, sob condições de alternância de períodos úmidos e secos (Purdy & Schmidt, 1996).

Naturalmente, *M. perniciosa* infecta uma gama de hospedeiros, permitindo que seus isolados sejam classificados em biótipos. O biótipo-C é responsável pela infecção do cacauero e de outras espécies dos gêneros *Theobroma* e *Herrania* (Griffith & Hedger, 1994), enquanto que o biótipo-S coloniza membros da família Solanaceae, principalmente as invasoras, como jurubeba (*S. paniculatum*) e lobeira (*S. lycocarpum*), com evidências de indução dos sintomas característicos (Bastos & Evans, 1985). Já o biótipo-L infecta lianas e cipós, sobretudo da família Bignoniaceae, sem induzir sintomas (Griffith & Hedger, 1994).

Atualmente, os métodos de contenção da vassoura-de-bruxa se restringem ao uso de podas fitossanitárias e aplicação de fungicidas ou agentes biológicos, que apresentam eficácia limitada. O uso de genótipos resistentes no campo representa o método mais efetivo e de longo prazo para o controle da enfermidade. Nesse contexto, a introdução de genes de resistência em cultivares é de suma importância para o reestabelecimento das cultivares de cacauero.

Sintomas típicos da infecção por *M. perniciosa* durante a fase biotrófica incluem inchamento e perda de dominância apical de ramos infectados, com a indução de brotações laterais, resultando na formação de “vassouras-verdes”. A infecção de flores em desenvolvimento promove a formação de frutos paternocárpicos e reversão de almofadas florais em ramos vegetativos, enquanto que a colonização de frutos em desenvolvimento leva à podridão dos mesmos (Purdy & Schmidt, 1996) (Figura 1). A fase biotrófica prolongada de infecção e os sintomas característicos da doença sugerem que este patógeno induza e/ou manipule o metabolismo primário e o balanço hormonal de sua planta hospedeira (Scarpari et al., 2005; Teixeira et al., 2014; Barau et al., 2014).

Figura 1 - Sintomas da doença “vassoura-de-bruxa” no cacaueteiro: formação de “vassouras-verdes”, “vassouras-secas”, frutos partenocárpicos e podridão de frutos



2.2 Alterações metabólicas após a infecção por patógenos biotróficos e hemibiotróficos em plantas

A infecção por patógenos pode resultar em amplas mudanças bioquímicas no metabolismo das plantas hospedeiras. As respostas de defesa contra patógenos desencadeiam mecanismos de reforço da parede celular, acumulação de fitormônios, espécies reativas de oxigênio (ROS), metabólitos secundários e a ativação de cascatas de proteínas quinase relacionadas à defesa, que causam uma reprogramação transcricional do hospedeiro (Wu et al., 2014). Os patógenos, por sua vez, secretam uma ampla variedade de moléculas capazes de interferir no reconhecimento e sinalização para mecanismos de defesa, suprimindo o sistema imune e reprogramando o metabolismo de seu hospedeiro para garantir a obtenção de nutrientes (Rovenich et al., 2014; Teixeira et al., 2014).

A complexidade das respostas de defesa contra a invasão de patógenos exige um suprimento de energia abundante, em geral advindo do metabolismo primário das plantas hospedeiras (Bolton, 2009). Durante as respostas de defesa, diversos genes associados ao metabolismo de carboidratos, como as vias da glicólise e do Ciclo do Ácido Cítrico (TCA) podem ser induzidos em plantas. Por sua vez, invertases de parede celular e hexokinases podem induzir respostas de defesa, como pela ativação de genes PR (*pathogenesis-related proteins*) que leva à resposta de hipersensibilidade no hospedeiro (HR) (Herbers et al., 1996; Xiao et al., 2000; Rojas et al., 2014; Figura 2).

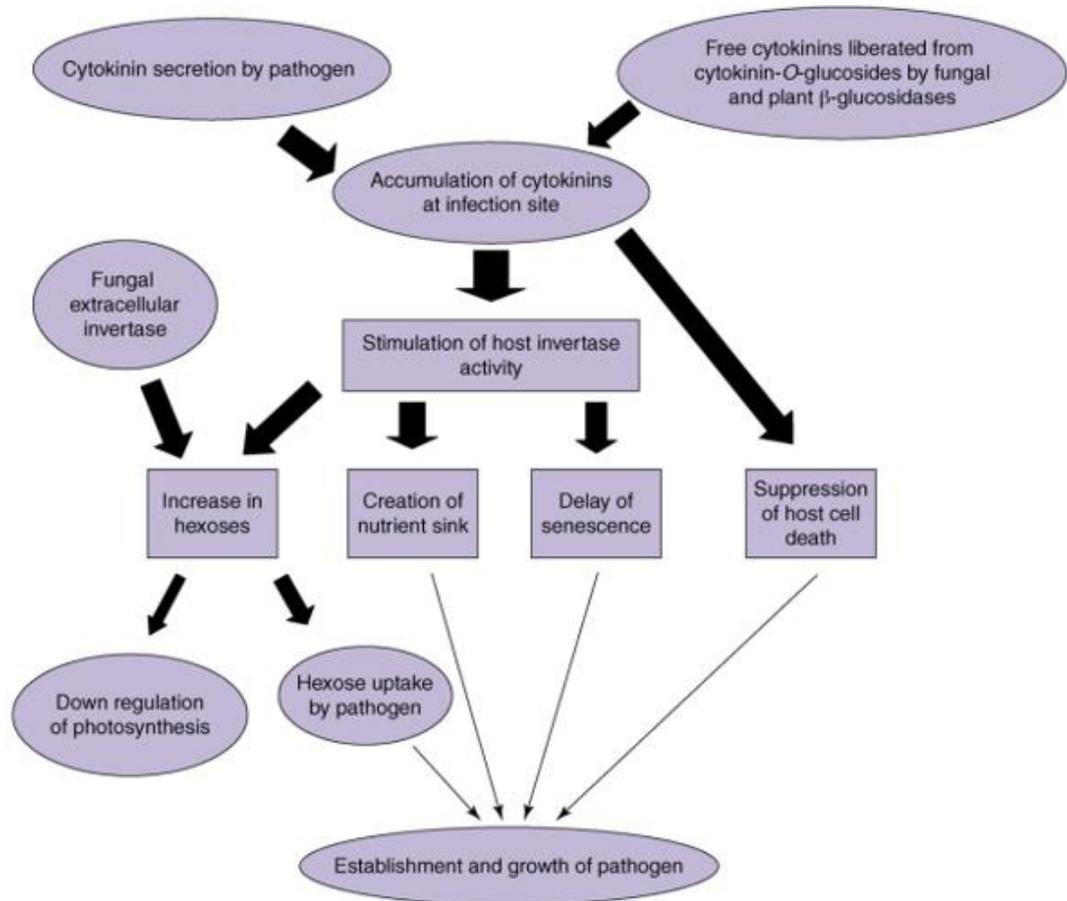
2007; Rojas et al., 2014). Uma hipótese para a participação de invertases na infecção por patógenos sugere que o aumento na atividade dessa enzima promove o acúmulo de hexoses, as quais sinalizam para a repressão de genes associados à fotossíntese, levando à redução na taxa fotossintética de folhas das plantas infectadas (Scholes et al., 1994). Os açúcares podem atuar como sinalizadores, podendo reprimir a expressão de genes associados à fotossíntese, como *CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN* e a subunidade pequeno da Rubisco, controlando a fotossíntese via *feedback* negativo (Krapp et al., 1993).

Um estudo com respeito à infecção por *Plasmodiophora brassicae* revelou a indução de genes de respostas a citocinina, bem como o aumento nos níveis de isopentenyl adenine, um tipo de citocinina, precedendo a iniciação da divisão celular do tecido (Devos et al., 2006). As células em divisão resultaram na formação de uma área meristemática, atuando como um dreno de nutrientes para sustentar o patógeno e desencadear a formação de galhas (Devos et al., 2006).

As citocininas foram sugeridas como o hormônio determinante na dinâmica fonte/dreno durante o desenvolvimento de plantas em infecções por agentes patogênicos, incluindo bactérias, vírus e fungos, sobretudo em infecções causadoras de formação de galhas (Jameson, 2000; Dhandapani et al., 2017). O hormônio citocinina é responsável pela indução de divisão celular, sendo comumente associado ao desenvolvimento de drenos em plantas, em consequência do efeito da regulação de invertases extracelulares em tecidos que demandam carboidratos (Kuiper, 1993; Roitsch et al., 2003). Além disso, a indução de invertases e transportadores de hexoses pelas citocininas sugere que o atraso da senescência, processo regulado por esse hormônio, seja mediado pela relação fonte e dreno da planta (Lara et al., 2004).

A despeito da capacidade de patógenos em manipular as citocininas das plantas hospedeiras, alguns fungos biotróficos e hemibiotróficos, como *Cladosporium fulvum*, *Blumeria graminis*, *Pyrenopeziza brassicae* e *Venturia inaequali*, são capazes de produzir e secretar citocininas (Robert-Seilaniantz et al., 2007). Além do papel na formação de drenos em plantas, citocininas de fungos podem apresentar um papel na supressão da morte celular das células do hospedeiro, permitindo o crescimento de fungos patogênicos biotróficos ou hemibiotróficos no tecido vivo do hospedeiro (Walters & Roberts, 2006; Figura 3).

Figura 3 - Modelo hipotético do papel para citocinina na formação de drenos de nutrientes em folhas de plantas infectadas por fungos patogênicos biotróficos



Fonte: Adaptado de Walters & Roberts (2006)

A infecção do tomateiro por *C. fulvum*, um patógeno biotrófico que se instala no apoplasto das folhas, induziu o acúmulo de glicose e frutose, bem como a diminuição de sacarose, devido a atividade de invertases tanto da planta quanto do fungo (Joosten et al., 1990). Nesse patossistema, as hexoses, glicose e frutose, foram convertidas em manitol, o qual foi exportado apoplasto, como papel sugerido na nutrição do patógeno (Joosten et al., 1990).

Durante a infecção por *Plasmodiophora brassicae*, causadora de galhas em arábida, foi observada uma alteração no metabolismo de carboidratos e realocação de nutrientes nas plantas infectadas (Evans & Scholes, 1995). Os altos níveis de açúcares (hexoses e sacarose) em galhas de arábida e, a baixa taxa fotossintética registrada em tecidos infectados, sugeriram a formação de drenos nutricionais (Evans & Scholes, 1995).

Outros estudos com respeito à infecção por *P. brassicae* revelaram a redução nos níveis de frutose-bisphosphate aldolase, proteína-chave na via da glicólise, sendo interpretada como uma mudança no metabolismo visando o aumento na produção de glicose pelo tecido infectado (Devos et al., 2006).

Em tomateiro, a inoculação com a bactéria patogênica *Pseudomonas syringae* promoveu alterações nos metabólitos primários e secundários, como a indução de aminoácidos, ácidos orgânicos, rutina e fenilpropanóides (López-Gresa et al., 2010). A redução nos níveis de açúcares sugere a utilização desses metabólitos tanto na geração de energia para ativar respostas de defesa, quanto para a produção de compostos secundários (López-Gresa et al., 2010). A ativação da via de fenilpropanóides é comum em respostas de defesa de plantas, podendo levar à síntese metabólitos secundários, com o objetivo de proteger a planta contra estresses bióticos e abióticos (López-Gresa et al., 2011).

Além disso, a comparação do metaboloma e transcriptoma pela infecção por dois fungos biotróficos e um hemibiotrófico: *U. maydis*, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* e *Colletotrichum graminicola* revelou a indução das vias da glicólise e ciclo TCA (Figura 3), elevada fotorrespiração, biossíntese de lipídeos e aminoácidos, e redução na biossíntese de sacarose e no Ciclo de Calvin. Foi sugerido que tais alterações metabólicas são respostas comuns a infecções por patógenos em cereais, sendo requerimentos do metabolismo energético durante a biotrofia (Voll et al., 2011).

A infecção pelo basidiomiceto *U. maydis* em milho induz a formação de tumor durante o crescimento do patógeno, o qual se instala no apoplasto do hospedeiro sem estruturas especializadas para nutrição, dependendo dos nutrientes ali disponíveis (Doehlemann et al., 2008). Foi demonstrado que a infecção por *U. maydis* induz a via da glicólise, ciclo TCA e metabolismo de lipídeos e a via de fenilpropanóides, através da expressão de *PHENYLALANINE AMMONIA LYASE* (PAL), levando à formação de lignina e flavonóides, sobretudo a antocianina (Doehlemann et al., 2008). Além disso, aparentemente, *U. maydis* pode reprogramar o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo durante sua infecção (Skibbe et al., 2010).

Mais recentemente, a infecção pelo fungo necrotrófico também revelou uma alteração no padrão de açúcares nos tecidos dreno, com participações distintas nos conteúdos de glicose e frutose ao redor da região de infecção. O ajustamento conteúdo de frutose foi sugerido como necessário ao aumento na resistência à infecção por esse patógeno (Lecompte et al., 2017).

2.3 Alterações bioquímicas decorrentes da infecção por *M. perniciosa*

As alterações bioquímicas resultantes da interação entre *M. perniciosa* e *T. cacao* foram descritas, inicialmente, em estudos do metabolismo primário, reportando aumento nos níveis de açúcares, como glicose, sacarose, frutose e inositol em plantas infectadas, além de baixa eficiência fotossintética em plantas com sintomas severos (Orchard & Hardwick, 1988). Aneja & Gianfagna (2001) reportaram o aumento na produção de cafeína em folhas jovens de *T. cacao* infectadas por *M. perniciosa*, sugerindo um papel para esse composto nas respostas de defesa à infecção. Da mesma forma, estudos bioquímicos em tecidos de *T. cacao* infectados por *M. perniciosa* revelaram alterações em metabólitos associados às respostas de defesa, como açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose), aminoácidos (asparagina), alcaloides (cafeína e theobromina), metabólitos secundários (taninos), etileno e glicerol (Scarpari et al., 2005). De acordo com isso, foi demonstrado que *M. perniciosa* pode ser cultivado em meio com glicerol como única fonte de carbono, sugerindo que esse composto possa atuar na manutenção do fungo em sua fase biotrófica (Meinhardt et al., 2006). Em tecidos infectados, também foram detectadas alterações na atividade de peroxidação de lipídeos e nos conteúdos de clorofilas a e b (Scarpari et al., 2005). Além disso, em frutos partenocárpicos de cacauero infectados por *M. perniciosa*, foram detectados níveis aumentados dos aminoácidos serina, treonina, valina, metionina, leucina e fenilalanina (Melnick et al., 2012).

A análise de RNA-seq da interação *M. perniciosa* x *T. cacao* estabeleceu um modelo molecular do patossistema, caracterizando genes de cacauero e de *M. perniciosa* expressos durante a fase biotrófica da infecção. A análise do transcriptoma permitiu a verificação da reprogramação metabólica e fisiológica durante a formação dos sintomas de vassoura-verde, com a indução de genes que codificam para a enzima invertase e para transportadores de hexose, e genes envolvidos no catabolismo de amido, lipídeos e aminoácidos, sugerindo que tecido infectado atue como um dreno nutricional. Foi também observada a redução da expressão de genes relacionados à fotossíntese e à biossíntese de amido, e a formação de folhas cloróticas e com taxas reduzidas de assimilação de CO₂ (Teixeira et al., 2014). Esses resultados revelaram um cenário de privação de carbono, responsável pela ativação de um processo de senescência prematura, promovendo a sinalização para necrose do tecido (Teixeira et al., 2014).

A análise do perfil transcriptômico de tecidos infectados de *T. cacao* por *M. perniciosa* também revelou a alteração de genes relacionados ao metabolismo secundário durante a fase biotrófica da infecção. Genes de biossíntese de compostos comumente associados à resposta de infecção por patógenos, como flavonóis, antocianinas, terpenoides, alcaloides e lignina foram induzidos. Genes que codificam para enzimas modificadores de parede celular

como expansinas, endonucleases, glicosil transferases e de biossíntese de celulose e hemicelulose também foram induzidos (Teixeira et al., 2014). Além disso, foi detectada a expressão aumentada de genes envolvidos na degradação de lipídios. Um dos subprodutos da metabolização de lipídeos é o glicerol (Teixeira et al., 2014), corroborando o conteúdo aumentado desse metabólito em tecidos infectados de *T. cacao* (Scarpari et al., 2005) e a manutenção do crescimento de *M. perniciosa* em glicerol, como única fonte de carbono (Meinhardt et al., 2006).

A avaliação de carboidratos especificamente no apoplasto de vassouras-verdes de cacauero demonstrou a alteração dinâmica de açúcares após a infecção por *M. perniciosa* (Barau et al., 2014). Altos níveis de glicose e frutose contrastaram os níveis reduzidos de sacarose, tendo em vista a atividade da enzima invertase. O acúmulo de hexoses no apoplasto e redução na taxa fotossintética de folhas de cacauero infectadas permitiu a sugestão da formação de dreno de nutrientes após a infecção por *M. perniciosa* (Barau et al., 2014).

2.4 Alterações hormonais decorrente da infecção por *M. perniciosa*

Os hormônios participam de diversos processos essenciais nas plantas. No estudo de resposta de defesa contra patógenos, os hormônios mais estudados são o ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) (Robert-Seilaniantz et al., 2007). Acredita-se que AS esteja relacionado à sinalização da resposta de defesa contra patógenos biotróficos e hemibiotróficos (Maleck et al., 2000), enquanto AJ e ET estão relacionados à resposta de defesa contra agentes necrotróficos (Glazebrook., 2005).

A análise do genoma de *M. perniciosa* estabeleceu o entendimento inicial dos fatores de patogenicidade desse fungo, revelando identificação de genes relacionados à via de biossíntese dos hormônios ácido giberélico e ácido indol acético (AIA) (Mondego et al., 2008). Além disso, bibliotecas gênicas subtrativas de cacauero infectado por *M. perniciosa* revelaram diferença de expressão entre o genótipo susceptível 'ICS 39' em relação ao resistente 'CAB 214' de genes ativados por ácido jasmônico (AJ), como os que codificam para proteínas inibidoras de protease, enzimas líticas da parede do fungo e enzimas com papel no metabolismo secundário, sobretudo associados a via dos fenilpropanoides (Leal et al., 2007). Ademais, análises de expressão gênica de cacauero resistente à "vassoura-de-bruxa" ('CAB 214') revelaram a indução de genes ligados à biossíntese de ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET), em relação ao genótipo suscetível ('P7'), sugerindo que o mecanismo de resistência a essa doença estaria sendo regulado por esses hormônios (Litholdo et al., 2015).

Na infecção de *T. cacao* por *M. pernicioso* foi observado aumento em níveis de AS (Chaves & Gianfagna, 2006; Kilaru et al., 2007) e ET (Scarpari et al., 2005). A atuação do hormônio ET na resposta de defesa foi associada as alterações fisiológicas resultantes das funções desse hormônio em plantas, como indução de senescência e morte celular do tecido (Van Loon et al., 2006). A investigação do transcriptoma da fase biotrófica da interação *M. pernicioso* e *T. cacao* revelou a presença de genes envolvidos com a biossíntese de ET (Teixeira et al., 2014), corroborando os níveis elevados de ET detectados em plantas de cacau nos estágios iniciais da infecção (Scarpari et al., 2005). Análises realizadas com um *software* ‘HORMONOMETER’ demonstraram uma correlação entre ET e a fase biotrófica da infecção, mas não apontaram para uma correlação com sinalização por AS ou AJ (Teixeira et al., 2014).

Com base nos sintomas característicos da fase biotrófica da “vassoura-de-bruxa”, como formação de vassouras-verdes, inchamento do caule e dominância apical, há indícios de que *M. pernicioso* altere o balanço hormonal de seu hospedeiro (Orchard et al., 1994; Mondego et al., 2008; Teixeira et al., 2014).

Acredita-se que os patógenos podem manipular as vias de hormônios de seus hospedeiros por dois motivos: a) suprimir as respostas de defesas incitadas por hormônios nas plantas; b) promover processos de desenvolvimento e mobilização de nutrientes na planta, facilitando sua colonização (Ma & Ma, 2016). Estudos de patossistemas sugerem que os hormônios auxina e citocinina desempenham um papel importante em doenças de plantas causadas por bactérias, vírus ou fungos, podendo ser os responsáveis por alterações morfológicas como formação de galhas e hipertrofias (Robinette & Matthyse, 1990; Malinowski et al., 2016).

Em geral, a auxina funciona como um regulador negativo em infecções por patógenos, aumentando a susceptibilidade do hospedeiro ao patógeno mediante a redução de genes envolvidos na resposta de defesa (Dominov et al., 1992), expressão de genes favoráveis à infecção pelo patógeno (Fu et al., 2011; Ludwig-Muller, 2015) ou indução de sintomas favoráveis à patogenicidade (Ma & Ma, 2016). Estudos de transcritos da fase biotrófica da infecção por *M. pernicioso* em *T. cacao* revelaram a expressão aumentada de genes relacionados à resposta a auxina e transportadores da classe PIN e PILS (*PIN-LIKE*) de auxina. No entanto, não foi encontrada diferença na expressão de genes

relacionados à biossíntese desse hormônio. Isso sugere que possivelmente a alteração de níveis de auxina seja devido à produção desse hormônio por *M. perniciosa* (Kilaru et al., 2007; Teixeira et al., 2014).

Por sua vez, o hormônio citocinina é capaz de promover divisão celular, processo que está associado ao crescimento e desenvolvimento da planta. Tecidos que estão sofrendo divisões celulares demandam por carboidratos, e por esse motivo, foi sugerido que a citocinina está associada à formação de drenos (Kuiper, 1993). Em plantas infectadas, as alterações mais comuns causadas pelo hormônio citocinina são mobilização de nutrientes, redução de taxa fotossintética, retardo de senescência e formação de drenos nas regiões de infecção (Walters & McRoberts, 2006). Consistente com isso, diversos estudos de patossistemas revelaram a formação drenos de nutrientes durante a infecção (Scholes et al., 1994; Berger et al., 2007; Rojas et al., 2014).

Em tecidos de cacau infectados por *M. perniciosa*, foi detectada a presença de um dos tipos do hormônio citocinina, zeatina ribosídeo, sugerindo que possivelmente esse hormônio estaria ligado com o inchamento dos ramos (Orchard & Hardwick, 1994). Em um perfil transcriptômico da interação *M. perniciosa* e *T. cacao*, Teixeira et al. (2014) não obtiveram uma visão clara da atuação de citocinina no estágio biotrófico da infecção. De maneira controversa, o gene IPT (*isopentenyltransferase*), envolvido na biossíntese de citocinina foi reprimido em tecidos infectados, e os genes de degradação (*cytokinin oxidases*) e inativação (*cytokinin glucosyltransferases*) desse hormônio foram induzidos. No entanto, acredita-se que a indução dos genes de degradação de citocinina ocorra devido ao *feedback* negativo resultante da presença desse hormônio na fase inicial da doença (Orchard et al., 1994; Teixeira et al., 2014). Da mesma maneira, Melnick et al. (2012), analisando a infecção de *M. perniciosa* em almofadas florais de cacau, detectaram elevada expressão de genes (*cytokinin dehydrogenase/oxidase*). Portanto, alterações dos hormônios auxina e citocinina poderiam estar associados aos principais sintomas da doença, como xilogênese (Marelli et al., 2009), proliferação de ramos laterais (Scarpari et al., 2005), perda de dominância apical e possível favorecimento de mobilização de nutrientes para os tecidos infectados (Teixeira et al., 2014; Barau et al., 2014).

Mais recentemente, um estudo da regulação hormonal na interação *M. perniciosa* biótipo-S x MT revelou níveis elevados de AJ, AS e ABA, auxina (Costa, 2017) e citocininas (J. L. Costa, comunicação pessoal, 10 de janeiro de 2018) em caules de plantas MT infectadas. Também foi demonstrada a indução de genes associados à biossíntese, ativação, degradação e resposta a citocininas e auxina. Ademais, a infecção de uma linha transgênica 35S::*AtCKX2*,

que superexpressa uma citocinina oxidase, resultando em menores níveis de citocinina (Pino et al., 2010; Costa, 2017) diferiu significativamente de MT, com menor engrossamento do caule e menor incidência de infecção. Com respeito à formação de sintomas, foi demonstrado que a alteração na sinalização e nos níveis dos hormônios auxina e citocinina provocam o engrossamento do caule, por meio do aumento dos tecidos xilema, floema e córtex, além da redução no crescimento e na biomassa radicular e alteração na morfologia e aumento no número de lóculos nos frutos (Costa, 2017).

2.5 Transição da fase biotrófica para necrotrófica na interação *M. pernicioso* x *T. cacao*

Inicialmente, foram sugeridas duas possíveis explicações para a necrose do tecido de cacauero após a infecção por *M. pernicioso*: a) mediada por efetores do fungo e b) desencadeada pela senescência precoce do tecido (Evans, 1980).

Em plantas de cacauero infectadas por *M. pernicioso* foram observados cristais de oxalato de cálcio, provavelmente produzidos por *M. pernicioso* (Ceita et al., 2007). O oxalato é capaz de remover íons de cálcio ligados à pectina, expondo a parede celular para a degradação por enzimas de *M. pernicioso*, sugerindo uma estratégia para o estabelecimento da patogênese desse fungo (Ceita et al., 2007). Um número aumentado de cristais foi observado no início da infecção por *M. pernicioso*, sendo reduzido nos estágios finais da fase biotrófica. Por conseguinte, foi sugerido um papel para esses compostos na morte celular do tecido de cacauero, antes do estágio necrotrófico da infecção (Ceita et al., 2007). De acordo com isso, foi reportada a expressão aumentada do gene *OXALO ACETATE ACETYLHYDROLASE*, essencial para a produção de ácido oxálico, na fase biotrófica de desenvolvimento de *M. pernicioso* (Rincones et al., 2008).

Cristais de oxalato de cálcio são tóxicos as células, uma vez que sua degradação por oxalato oxidase induz à produção de H_2O_2 (Ceita et al., 2007; Rio et al., 2008). Além disso, um dos subprodutos da degradação de pectina, presente na parede celular, é o metanol. Foi demonstrado que *M. pernicioso* produz uma enzima metanol oxidase, capaz de metabolizar o metanol (Oliveira et al., 2012), corroborando o crescimento de desse fungo em meio de cultura com metanol (Mondego et al., 2008).

O cultivo *in vitro* de *M. pernicioso* em meio com glicerol como única fonte de carbono demonstrou a manutenção desse fungo em sua fase monocariótica, sugerindo um papel para o glicerol na manutenção da fase monocariótica extensa de *M. pernicioso* em cacauero (Meinhardt et al., 2006). Por sua vez, Pungartnik et al. (2009) sugeriram que a presença de H_2O_2

no meio de cultivo com glicerol pode funcionar como uma sinalização para a dicarionização do micélio do fungo e, eventualmente, a morte do tecido celular.

A análise de sequências do genoma de *M. perniciosa* permitiu a identificação de genes que codificam proteínas de necrose induzidas por etileno, *MpNEP 1, 2 e 3* (Garcia et al., 2007). No entanto, foi demonstrado que esses genes não são induzidos nos primeiros sinais de necrose (Zaparoli et al., 2011), demonstrando que as proteínas MpNEP não são os fatores desencadeantes de necrose do tecido após a infecção por *M. perniciosa* em cacau, mas atuam durante a progressão da necrose, favorecendo seu sucesso (Teixeira et al., 2014).

No genoma de *M. perniciosa* também foi identificado um gene que codifica uma oxidase alternativa (*Mp-AOX*) (Mondego et al., 2008). Níveis elevados de *transcritos Mp-AOX* foram observados durante a fase biotrófica da infecção por *M. perniciosa*. Além disso, o bloqueio da cadeia respiratória dependente de citocromo (CRC) em cultura *in vitro* de *M. perniciosa* preveniu a transição desse patógeno da fase monocariótica para dicariótica, sugerindo um papel para Mp-aox na regulação na transição de fases da infecção (Thomazella et al., 2012). Por sua vez, o bloqueio de CRC e de Mp-AOX inibiu o crescimento de *M. perniciosa in vitro* (Thomazella et al., 2012).

A análise transcriptômica da interação *M. perniciosa* x *T. cacao* revelou um cenário de privação de carbono, responsável pela ativação de um processo de senescência prematura, promovendo a sinalização para necrose do tecido (Teixeira et al., 2014). Foi demonstrado que além de carboidratos e lipídeos, aminoácidos também foram utilizados para sustentar a região de infecção e o metabolismo das plantas infectadas. A indução de um gene que codifica uma asparagina synthase foi relacionado à produção de asparagina, que está associada à situação de reduzida disponibilidade de carbono e senescência (Teixeira et al., 2014), corroborando os níveis aumentados de asparagina em vassouras-verdes de cacau (Scarpari et al., 2005).

Da mesma forma, um estudo da regulação de açúcares intracelulares em vassouras-verdes de cacau após a infecção por *M. perniciosa* propôs que a transição de fase do ciclo de vida desse fungo ocorre em consequência da baixa disponibilidade de carbono no apoplasto, em contraste com o aumento nos açúcares intracelulares, desencadeando o processo de senescência (Barau et al., 2014). Esses resultados corroboram o modelo proposto por Evans (1980), que sugeriu que a presença de açúcares redutores pode atrasar o processo de transição do fungo para a necrose do tecido. Ensaios *in vitro* de *M. perniciosa* revelaram a indução de MpNEP em resposta à privação de carbono, enquanto que a manutenção do carbono no meio de cultivo atrasou a expressão desse gene e, conseqüentemente, a necrose do tecido (Barau et al., 2014).

2.6 Utilização de MT como planta modelo nos estudos de infecção por *M. perniciosa*

Por inoculação artificial, o biótipo-S de *M. perniciosa* é capaz de colonizar o tomateiro (*S. lycopersicum*), permitindo a utilização da cultivar ‘Micro-Tom’ (MT) no estudo de mecanismos de defesa contra *M. perniciosa* (Marelli et al., 2009; Deganello et al., 2014). MT demonstrou ser um modelo genético adequado para o estudo da interação com *M. perniciosa*, exibindo os sintomas característicos de hipertrofia, hiperplasia e formação de vassouras (Deganello et al., 2014). As características que qualificam essa cultivar como modelo incluem seu porte reduzido, podendo ser cultivado em altas densidades, ciclo de vida curto (3 a 4 gerações ano⁻¹) (Meissner et al., 1997), genoma sequenciado (*The Tomato Genome Consortium*, 2012), metodologia de transformação otimizada (Pino et al., 2010) e disponibilidade de coleção de mutantes/linhas transgênicas no mesmo background (Carvalho et al., 2011).

Portanto, a utilização de MT permite a transposição de barreiras biológicas do cacaueteiro, como ciclo reprodutivo longo, baixa eficiência no cultivo *in vitro* e recursos genéticos limitados para estudo (Figueira & Alemanno, 2005). Além disso, a possibilidade da infecção por ambos os biótipos -C e -S em MT, permite a comparação de respostas de defesa compatível e não compatível, bem como a elucidação dos fatores que discriminam as mesmas (Deganello et al., 2014).

Nosso grupo de pesquisa vem buscando elucidar os fatores associados à infecção por *M. perniciosa* no sistema modelo MT. Inicialmente, o trabalho realizado por Deganello et al. (2014) demonstrou que a infecção pelo biótipo-S de *M. perniciosa* induziu a formação de sintomas similares aos sintomas da infecção pelo biótipo-C em cacaueteiro. Por outro lado, a inoculação com biótipo-C em MT não levou à formação de sintomas típicos, mas reduziu a altura das plantas, caracterizando uma resposta do não hospedeiro. A superexpressão do gene de *T. cacao* *BAX-INHIBITOR-1* reduziu a incidência de infecção de *M. perniciosa* em MT, dificultando a penetração dos esporos no tecido e, conseqüentemente, restaurando parcialmente a resistência do não hospedeiro (Scotton et al., 2017).

Mais recentemente, o RNA-seq da interação *M. perniciosa* biótipo-S x MT foi fundamental para a compreensão da alteração de vias hormonais e do metabolismo de plantas MT infectadas (Costa, 2017). Esse trabalho demonstrou que a alteração na sinalização e nos níveis dos hormônios auxina e citocinina são os principais responsáveis pela formação dos sintomas notáveis pela infecção por *M. perniciosa* (Costa, 2017).

2.7 O estudo da metabolômica

Os metabólitos determinam a assinatura fenotípica das plantas, retratando as características genéticas, epigenéticas, de transcritos e proteínas. Atualmente, o estudo de metabólitos ainda é um desafio, tendo em vista a complexidade e diversidade estrutural e funcional dos compostos de interesse. As plantas compreendem por volta de 200.000 compostos de concentrações variáveis (Fiehn et al., 2000), os quais são tradicionalmente separados em metabólitos primários, ou essenciais à viabilidade celular, e secundários, ou necessários para a viabilidade do organismo no ambiente (Tenenboim & Brotman, 2016). Os metabólitos primários, ou gerais, estão amplamente distribuídos entre as plantas, como os hormônios, carboidratos e aminoácidos. Por sua vez, metabólitos secundários, ou especializados, estão separados em classes de metabólitos como as terpenoides, alcaloides, fenilpropanoides, glucosídeos, e glucosinolatos, e sua produção pode ser restrita a espécies ou famílias de plantas (Sørensen et al., 2018).

O metabolismo desempenha papel fundamental nos seres vivos, e é primeiramente delimitado pelos produtos gênicos, mas depende também de outros fatores. Visto que a função biológica de diversos genes ainda é desconhecida e que o conhecimento dos fluxos metabólicos em plantas é limitado, mais estudos com respeito à síntese de metabólitos em plantas, bem como em interações planta-patógenos, são necessários.

A metabolômica é uma técnica complementar à genômica, transcriptômica e proteômica, visando a quantificação de compostos de vias metabólicas para atribuir conhecimento as interações moleculares biológicas. Não existe ainda um único método capaz de identificar todas as alterações metabólicas em um dado momento em uma planta. Consequentemente, metodologias complementares têm sido utilizadas a fim de contribuir com a identificação de metabólitos em um determinado contexto. A metabolômica foi sugerida como uma metodologia eficaz para a identificação de respostas a estímulos nas plantas, incluindo a infecção por patógenos (López-Gresa et al., 2010; Lee et al., 2016; Schaker et al., 2017).

A espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (NMR) é um método que visa analisar os metabólitos produzidos pela célula ou tecido em um dado momento. Ao contrário de outros métodos analíticos, NMR possibilita a quantificação dos metabólitos em misturas, não sendo necessário fracioná-las (Kim et al., 2010; Roberts, 2000). Portanto, o uso deste método parece ser conveniente para a análise simultânea de diferentes grupos de metabólitos primários e secundários. Os sinais emitidos por NMR são proporcionais as concentrações molares dos compostos detectados, refletindo assim a concentração molar presente no material avaliado (Kim et al., 2010; van der Sar et al., 2013) e possibilitando a comparação direta entre

metabólitos. Entretanto, a maior limitação de NMR é sua baixa sensibilidade, demandando amostras grandes, quando comparado a análises por outros métodos analíticos (Kim et al., 2010).

Por sua vez, a espectrometria de massas acoplada à cromatografia é uma tecnologia amplamente empregada na análise de metabólitos devido sua alta sensibilidade e seletividade em comparação com outras plataformas (Jorge et al., 2016). Na espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa (GC-MS), compostos polares não voláteis são derivatizados para tornarem-se voláteis e, em seguida, são separadas por cromatografia. Posteriormente, a espectrometria de massas permite a geração e extração de íons, sendo separados segundo as razões massa-carga (m/z). Os íons separados são detectados, e o sinal é enviado ao sistema de dados, aonde as razões massa-carga são armazenadas, juntamente com sua abundância relativa, sendo exibidos em forma de espectro (Allwood et al., 2007). Diversos bancos de dados disponíveis auxiliam na anotação dos picos. Essa metodologia facilita a identificação e quantificação de diversos compostos como açúcares, aminoácido, ácidos orgânicos e poliaminas, resultando em uma boa cobertura para desvendar alterações nas vias de metabolismo primário.

Vale ressaltar que os procedimentos de extração de metabólitos para ambas as metodologias, NMR e GC-MS podem ser relativamente tendenciosos à solubilidade das moléculas no solvente escolhido (Heuberger et al., 2014).

2.8 Dinâmica de trocas gasosas e do transporte de água em plantas

A transpiração e o movimento de água nas plantas são afetados pela abertura dos estômatos e pela condutância hidráulica dinâmica das raízes, caule e folhas (Kelly et al., 2017). Os estômatos são poros envolvidos com a transpiração, bem como com a captação de CO_2 utilizado nas reações da fotossíntese (Aung et al., 2018). O movimento da água é dirigido pelo gradiente de potencial hídrico ($\Delta\Psi$), de modo que a água se movimenta a partir de áreas com elevado potencial para áreas com baixo potencial hídrico (Kelly et al., 2017). A base das raízes apresenta uma pressão positiva enquanto que as folhas apresentam pressão negativa, criada pelas paredes células das células do mesófilo e pela transpiração da água pelos estômatos (Aung et al., 2018).

Para maximizar a obtenção de água, plantas desenvolveram um sistema complexo de raízes que se espalham pelo solo, aumentando o acesso à água. Embora todas as partes das raízes sejam capazes de captar água, as coifas e os pelos radiculares são responsáveis pela maior absorção (Aung et al., 2018).

A evaporação da água devido à abertura dos estômatos reduz os valores de Ψ foliar, dirigindo o movimento da água dos vasos do xilema para as folhas. Esse processo cria uma pressão negativa no xilema, permitindo a absorção de água pela raiz, que em seguida se movimenta para as folhas, sendo perdida pela transpiração. No entanto, o fluxo de água nas plantas através das membranas celulares pode sofrer resistência hidráulica. Nesse sentido, aquaporinas são canais de água transmembrana que facilitam o transporte de água pelas membranas, afetando a condutância hidráulica das plantas (Kelly et al., 2017).

Uma vez que o Ψ das células do mesófilo apresenta maiores valores em relação ao Ψ da atmosfera, as plantas perdem a maior parte da água que absorvem pelas raízes, como compensação pelo CO_2 obtido da atmosfera. Dois mecanismos contrabalanceados são responsáveis pela regulação da dinâmica de água em plantas: 1) a condutância estomática (g_s), que controla as trocas gasosas através da transpiração (E); 2) a condutividade hidráulica do sistema vascular, que controla a taxa de água que entra pela raiz, e a condutância hidráulica, que controla o fluxo de água para fora das folhas pela transpiração (Moshelion et al., 2015).

Os estômatos podem responder à redução no Ψ foliar, reduzindo a taxa transpiratória (E). Assim, para a manutenção da abertura dos estômatos, a condutância hidráulica foliar, e as condutividade e condutância hidráulica do caule devem ser suficientemente altas. No entanto, quando a evaporação de água excede o fornecimento de água para a transpiração, a condutância estomática (g_s) é reduzida, protegendo a planta contra a desidratação e o sistema hidráulico contra a cavitação (Moshelion et al., 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Foram utilizadas plantas ‘Micro-Tom’ (MT), e os mutantes *sft*, *lutescent* e *green flesh* e linhas transgênicas 35S::*CKX2* e 35S::*SFT* introgrididos na cv. ‘Micro-Tom’ (Tabela 1), cujas sementes foram gentilmente disponibilizadas pelo Prof. Dr. Lázaro Peres, responsável pelo Laboratório de Controle Hormonal e Desenvolvimento Vegetal na ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

Tabela 1 - Mutantes para as vias de florescimento e senescência e linhas transgênicas associadas ao metabolismo do hormônio citocinina e à via de florescimento introgrididos na cv. MT foram utilizados para inoculação com *M. perniciosa*

Mutantes	Descrição
<i>single flower truss (sft)</i>	Defectivo no fator de transcrição CETS que atua na indução de florescimento. Forte desenvolvimento vegetativo, com atraso de florescimento e redução no número de inflorescências e flores por inflorescência (Molinero-Rosales et al., 2004).
<i>green flesh (gf)</i>	Defectivo no gene que codifica para a proteína stay-green necessária à degradação de clorofila (Akhtar et al., 1999).
<i>lutescent (l)</i>	Plantas com o alelo defectivo MT- <i>l</i> que apresentam senescência prematura, com amarelamento prematuro de folhas (Jen, 1974).
Linha Transgênica	Descrição
35S:: <i>CKX2</i>	Superexpressão do gene <i>AtCKX2</i> , que resulta em baixos níveis de citocinina (Pino et al., 2010; J. L. Costa, comunicação pessoal, 10 de janeiro de 2018).
35S:: <i>SFT</i>	Superexpressão de <i>SFT</i> sob controle do promotor CaMV35S. Fenótipo com menor número de folhas antes da primeira inflorescência (Silva, 2016).

3.2 Produção de basidiósporos de *M. perniciosa* biótipo-S

Basidiocarpos de *M. perniciosa* do biótipo-S foram obtidos de vassouras-secas de ramos naturalmente infectados de lobeira (*Solanum lycocarpum*) coletadas em Tiradentes, MG. As vassouras secas foram expostas a ciclos alternados de umidade (8 h) e seca (16 h), sob fotoperíodo de 12 h e temperatura média de 25°C, para induzir a formação de basidiocarpos. Os basidiocarpos produzidos foram colhidos regularmente, tendo seus estipes removidos e fixados pelo píteo por gel 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).

3.3 Preparo das mudas

Sementes de MT e de mutantes e linhas transgênicas foram germinadas em bandejas com células contendo substrato PlantMax HT + vermiculita expandida (1:1), 0,4% NPK (m/v) e 0,4% calcário (m/v) (<http://www.esalq.usp.br/tomato/MMTCap2.pdf>). Após 14 dias da semeadura, as plântulas foram transplantadas para vasos de 250 mL com mesmo substrato, 0,8% NPK (m/v) e 0,4% calcário (m/v). As plantas foram mantidas sob condições controladas em câmara de crescimento a 25°C, fotofase 14 h e 80% de umidade relativa.

3.4 Inoculação com *M. perniciosa* biótipo-S

Dois dias após o transplante, as plantas foram inoculadas, com auxílio de uma micropipeta. O volume de 70 µL da suspensão de concentração 10^6 de basidiósporos, misturados em solução 0,3% ágar-água (m/v) foi aplicado nas regiões do ápice caulinar e gemas axilares do primeiro par de folhas de cada planta, sendo em seguida mantidas em câmara úmida por 48 h. Plantas controle (não infectadas) foram inoculadas somente com solução 0,3% ágar-água (m/v).

A inoculação com *M. perniciosa* de frutos foi realizada furando e aplicando 30 µL da suspensão de concentração 10^6 de basidiósporos misturados em solução 0,3% ágar-água (m/v) em um fruto proveniente de planta MT não infectada com *M. perniciosa* e dois frutos de plantas MT previamente infectadas por *M. perniciosa*. Dois frutos controles, de plantas MT não infectadas, foram inoculados somente com solução 0,3% ágar-água (m/v).

3.5 Avaliação dos sintomas de plantas MT após inoculação com *M. perniciosa*

Plantas MT foram inoculadas com *M. perniciosa* como descrito em 3.4. As plantas foram avaliadas para altura (cm) e diâmetro do caule (mm) na altura do primeiro par de folhas verdadeiras da base para o topo da planta, utilizando um paquímetro, nos tempos 5, 15, 25 e 35 dias após a inoculação (DAI). A massa seca (g) de caules e massa seca e comprimento de raízes foram avaliados aos 40 DAI. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (3 parcelas com 5 plantas; $n=5$). Os resultados foram submetidos ao teste *t*, com diferença significativa a 5%, utilizando o software R x64.3.3.1. Para todas as análises de teste *t* nesse trabalho foram realizados testes de verificação das pressuposições do teste *t*, como de

homogeneidade de variância entre os tratamentos por meio do teste Levene, e normalidade dos dados por meio do teste Shapiro-Wilk, utilizando o software R x64.3.3.1.

3.6 Cultivo de *M. pernicios*

Para obtenção de micélio para extração de DNA, *plugs* de ágar contendo o micélio do isolado Tiradentes de *M. pernicios* biótipo-S foram cultivados em meio MYEA (5 g L⁻¹ extrato de levedura e 30 g L⁻¹ extrato de malte, pH 6,8) por 15 dias no escuro à temperatura ambiente. Três réplicas biológicas do micélio dicariótico foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido. Os micélios foram submetidos a um moinho criogênico (Cryo Mill, Retsch, Haam, Alemanha) para maceração homogênea.

3.7 Extração de DNA

Seis replicatas de caules (divididos em caule com sintoma e caule sem sintoma), pecíolos, folhas, raízes e frutos de plantas MT inoculadas ou não com *M. pernicios* e foram coletadas aos 40 DAI. Os tecidos vegetais foram macerados em moinho criogênico. DNA total do material vegetal foi extraído pelo método Doyle & Doyle (1987), otimizado para extração de micélio de fungo. O volume de 500 µL de tampão CTAB (3% CTAB, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA, 1% PVP) foi adicionado ao tecido macerado e aquecido a 65°C por 30 min. Em seguida, foi adicionado 300 µL de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1) e 300 µL de fenol equilibrado e centrifugado a 10.000 g por 5 min. O sobrenadante foi transferido e a etapa anterior foi repetida. O sobrenadante foi transferido novamente, no qual foi adicionado 60 µL de 3 M de acetato de sódio e 1,2 mL de 95% etanol gelado. As amostras foram incubadas por 30 min e centrifugadas a 1.000 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e lavado com 70% etanol. O pellet resultante foi ressuscitado em TE+RNase (10 µg mL⁻¹). Para verificar a integridade e a concentração do DNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de 1% agarose. A quantificação do DNA foi realizada em fluorômetro *Qubit* (ThermoFisher Scientific).

3.8 Análise de quantificação por qPCR

Para amplificação das regiões *ITS* foram utilizados *primers* específicos de *M. pernicios* CpSitsF88 (GGACGTTGAGCTGGCTCTTG) e CpXitsR186 (AAGCGCCTCCCTATTCCAG) (Gareth Griffith, comunicação pessoal). A amplificação dos genes *CHALCONE SYNTHASE 2 (CHS2)* de *S. lycopersicum* foi realizada utilizando os *primers* TTCGGTTAAGCGGCTCATGA e CTCGAGACCCTTGTTGTTCTC. O volume de 1 µL de

DNA nas concentrações 10 ng ou 20 ng foi adicionado a uma reação de 10 μ L de SYBR Green (Invitrogen). As amplificações foram conduzidas no termociclador *RotorGene-6000* (Qiagen) 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, 60 ° C por 30 s e 72 ° C por 30 s, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. Duas replicatas técnicas foram analisadas para cada replicata biológica. O experimento incluiu um controle negativo utilizando água em substituição ao DNA.

3.9 Análises de trocas gasosas

As análises de taxa fotossintética líquida (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), taxa transpiratória (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e concentração de CO_2 intercelular (C_i) foram determinadas utilizando o analisador de gases no infravermelho (IRGA; LI6400xt, Licor, Nebraska, EUA) acoplada a uma câmara de fluorescência para folhas (6400-40). Todas as análises foram conduzidas a temperatura de 25°C, com radiação fotossinteticamente ativa ($800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), concentração atmosférica de CO_2 (C_a , $\sim 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e umidade relativa ($\sim 60\%$). Foram analisadas uma folha com sintoma (clorótica) e uma folha sem sintoma (não clorótica) na altura do terço médio (terceira folha verdadeira contando desde a base para o topo das plantas) de plantas MT infectadas por *M. pernicioso* aos 25 DAI, em comparação a duas folhas na altura do terço médio de plantas não infectadas. As mesmas plantas foram utilizadas para as análises de área foliar, potencial hídrico foliar e condutância e condutividade hidráulica. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado ($n=10$). Os resultados das medições foram submetidos ao teste t utilizando o software R x64.3.3.1. As análises de trocas gasosas, área foliar, potencial hídrico foliar e condutância e condutividade hidráulica foram realizadas no Laboratório de Estudos de Plantas sob Estresse, na ESALQ/USP, Piracicaba, SP, sob coordenação do Prof. Ricardo Ferraz.

3.10 Análises de área foliar

As análises de área foliar total (cm^2) de plantas MT infectadas em comparação com plantas MT não infectadas foram realizadas através do destacamento e inserção das folhas em um integrador de área foliar modelo LI-3100C (Licor, Nebraska, EUA). Os resultados foram submetidos ao teste t , com diferença significativa a 5%, utilizando o software R x64.3.3.1.

3.11 Análises de potencial hídrico foliar

O potencial hídrico de folhas foi medido por psicrometria de par termoelétrico, que se fundamenta no efeito Peltier, utilizando um psicrômetro (PSYPRO Water potential System, WESCOR, Inc, Logan, EUA) acoplado a câmaras Wescor C52. Discos de folhas com sintoma (cloróticas) e folhas sem sintoma (não cloróticas) na altura do terço médio (terceira folha verdadeira contando desde a base para o topo das plantas) de plantas MT infectadas ou não por *M. perniciosa* aos 35 DAI, foram inseridos e mantidos nas câmaras do psicrômetro pelo tempo necessário para o estabelecimento do balanço de água entre o ar disponível na câmara e o disco foliar. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado ($n=10$). Os resultados das medições foram submetidos ao teste t, com diferença significativa a 5%, utilizando o software R x64.3.3.1.

3.12 Análises de condutância e condutividade hidráulica do caule

As análises de condutância e condutividade hidráulica do caule foram realizadas a partir do corte de um segmento de caule de plantas infectadas por *M. perniciosa* [caules foram fracionados em região de engrossamento (com sintoma) e região acima do engrossamento (sem sintoma)], comparando com segmentos de caules de plantas não infectadas, aos 35 DAI. O sistema hidráulico de sucção para as análises foi construído no Laboratório de Estudos de Plantas sob Estresse, na ESALQ/USP, Piracicaba, SP (Reis, 2013). Para as análises de condutância e condutividade hidráulica via sucção, caules foram seccionados em segmentos (região engrossamento e região acima do engrossamento) e parcialmente inseridos e fixados em tubos de silicone (12 mm), propriamente vedados com silicone de adição (FuturaAD) evitando a entrada de ar e criando vácuo no sistema. Os tubos de silicone interconectam a bomba peristáltica ao segmento de caule. Para a realização das medições, a extremidade da parte inferior (perto da raiz) do caule foi submergida em água, de modo a permitir a sucção da água através do tubo de silicone quando a tensão (0,03 MPa) foi aplicada ao sistema hidráulico. Em determinado tempo de tensão aplicada, amostras de algodão situadas no interior do sistema hidráulico se tornaram umedecidas, adquirindo uma massa em um determinado tempo. Os tempos de medição variaram entre as amostras analisadas, conforme a observação do fluxo de água através do tubo de silicone.

Para obtenção da condutância hidráulica algodões secos e umedecidos do sistema hidráulico foram pesados, permitindo o cálculo do fluxo volumétrico ($J_v \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) absorvido pelo sistema vascular do caule, dividido pela tensão aplicada ($T \text{ MPa}$) e pela área do caule ($A \text{ m}^2$). J_v é calculado seguindo a expressão:

$$Jv = \frac{Pu - Ps}{t \cdot \rho}$$

Onde:

Pu : peso úmido do algodão (Kg)

Ps : peso seco do algodão (Kg)

t : intervalo de tempo em s^{-1}

ρ : densidade da água ($Kg\ m^{-3}$)

Assim, o cálculo para a determinação de condutância hidráulica do caule ($m^3\ Mpa^{-1}s^{-1}$)

é:

$$\text{Condutância hidráulica do caule} = \frac{Jv}{T \cdot A}$$

Onde:

T : tensão aplicada (MPa)

A : área do caule (m^2)

Por sua vez, o procedimento de medição da condutividade hidráulica também consiste nas pesagens de algodões secos, em intervalos de tempo conhecidos, permitindo o cálculo do fluxo volumétrico ($Jv\ m^3s^{-1}$) absorvido pelo sistema vascular do caule. No entanto, Jv é dividido pela tensão aplicada ($T\ MPa$) e pelo comprimento do segmento do caule ($c\ cm$).

Assim, o cálculo para a determinação de condutividade hidráulica do caule ($m^3\ Mpa^{-1}cm^{-1}$) é:

$$\text{Condutividade hidráulica do caule} = \frac{Jv}{T \cdot c}$$

Onde:

T : tensão aplicada (MPa)

c : comprimento segmento do caule (cm)

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado ($n=9$). Os resultados foram submetidos à ANOVA, seguido do teste de Tukey, utilizando o software R x64.3.3.1. Foram realizados os testes de verificação das pressuposições da ANOVA, como de homogeneidade de variância entre os tratamentos, por meio do teste Levene e normalidade dos resíduos, por meio do teste Shapiro-Wilk, utilizando o software R x64.3.3.1.

3.13 Análises por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa com analisador por Tempo de Voo (GC-MS-TOF)

Caules de plantas MT inoculadas ou não com o biótipo-S foram coletados nos períodos 4, 10, 20 e 30 dias após inoculação (DAI) em seis réplicas biológicas, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Após o congelamento, o material foi submetido a um triturador criogênico (Cryo Mill, Retsch, Haam, Alemanha) para maceração homogênea do tecido vegetal. Uma alíquota de 50 mg de tecido vegetal em pó fino foi pesada e transferida para tubos criogênicos de fundo redondo com rosca externa (2 mL; 12x48 mm). As análises foram conduzidas no Laboratório de Metabolômica (LabMet), sob coordenação da Dra. Camila Caldana, no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), Campinas, SP. Para extração de metabólitos, foi realizado um método separação de fases, fornecendo uma fase apolar, uma fase contendo metabólitos polares e semipolares e um pellet contendo amido e proteínas. Uma mistura de solvente contendo MTBE, MeOH e H₂O (3:1:1, v/v) (Giavalisco et al., 2011) foi adicionada ao tecido vegetal, e as amostras foram agitadas por 30 min a 4°C, incubadas por 10 min em ultrasonicador resfriado, vortexadas e centrifugadas por 5 min a 4°C. Em seguida, a fração de metabólitos polares e semipolares foi separada e submetida à derivatização química. Uma alíquota do sobrenadante foi submetida a vácuo por 6 a 16 h, e o resíduo resultante redissolvido e derivatizado em cloridato de metinamina por 90 min a 30 °C, seguido da adição de N-metil-N-trimetilsilil fluoroacetamida (MSTF) e uma mistura padrão de índice de tempo de retenção por 30 min a 37 °C (Roessner et al., 2000). O resultante foi transferido para tubos específicos de análise GC-MS. O volume de 1 mL foi injetado no modo “splitless” com conjunto de fluxo de transportador de gás hélio a 230 °C. Os dados de GC-TOF-MS foram obtidos usando um Combi-PAL com amostrador automático (Agilent Technologies; Waldbronn, Alemanha) acoplado a um cromatógrafo gasoso (Agilent 7890) e um espectrômetro de massa (Leco Pegasus; LECO, St. Joseph, MI, EUA) (Weckwerth et al., 2004). A identificação e quantificação dos picos foi realizada com o auxílio do *software* Pegasus (Leco). Os cromatogramas foram exportados do software Leco ChromaTOF (versão 4.51.6.0) para plataforma R. O pacote TargetSearch (Bioconductor) foi utilizado para detecção dos picos, alinhamento do tempo de retenção e comparação com bibliotecas (Cuadros-Inostroza et al., 2009). Os metabólitos foram quantificados pela intensidade dos picos de sua massa quantitativa. A normalização das intensidades dos metabólitos foi realizada a partir da divisão da massa fresca, seguida da soma total de contagem de íons (Giavalisco et al., 2011). A normalização dos dados de metabólitos foi feita pela divisão de cada valor pela média de todas as medições para um metabólito.

Para efeito comparativo dos dados de metabolômica, foi realizada análise de componentes principais (PCA), empregando o pacote *pcaMethods bioconductor* (Stacklies et al., 2007). Para análise estatística, os tratamentos para um período específico de amostragem foram comparados por teste *t*, com diferença significativa a 5%.

3.14 Análises por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹H-RMN)

Caules de plantas MT inoculadas ou não com o biótipo-S foram coletados nos períodos 4, 10, 20 e 30 DAI, com número de replicatas *n*=1, *n*=4, *n*=5 e *n*=5, respectivamente, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Após o congelamento, o tecido vegetal foi submetido a um moinho criogênico (Cryo Mill, Retsch, Haam, Alemanha) para maceração homogênea e submetido à liofilização por dois dias. Para a investigação metabolômica, o protocolo de extração foi modificado e otimizado para caule de MT, visando à obtenção do maior número de sinais nos espectros resultantes (Mirnezhad et al., 2010; Kim et al., 2010; López-Gresa et al., 2012). Um total de 30 mg de tecido vegetal em pó fino liofilizado foi pesado e transferido para microtubos, adicionados a uma mistura de solvente de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 6,0) em D₂O, contendo 0,05% de ácido 3-(trimetilsilil)propionico-D₄, sal sódica (TMSP) e metanol deuterado (CH₃OH-d₄) (1:1 v/v), visando principalmente a extração de compostos polares. As amostras foram vortexadas por 30 s, submetidas à sonicação por 15 min e centrifugadas a 13000 rpm, por 15 min. O volume de 600 µL do sobrenadante foi transferido para um tubo de RMN (5 mm; 7 polegadas, (DEUTERO)). Os espectros foram obtidos em espectrômetro de ressonância magnética de 14,1 Tesla ou 600 MHz na frequência do hidrogênio (Bruker UltraShieldPlus) equipado com sonda criogênica de 5 mm e ATMA (*Automatic Tuning Matching*), localizado no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear sob coordenação do prof. Antônio Gilberto Ferreira da UFSCar, São Carlos, SP. A sequência de pulso foi também otimizada para as amostras de caule de MT. Metanol deuterado foi usado como *lock* interno. Cada espectro consistiu em 128 *scans* com tempo total de 12 min e 54 s seguindo os seguintes parâmetros: janela espectral com 20 ppm; tempo de aquisição de 2,72 s; *relaxation delay* de 2.0 s; pulso de 90° de 9,43 s; número de pontos de 65 K e *mixing time* de 0,20 s. Uma sequência de pré-saturação foi usada para suprimir o sinal residual de H₂O. As intensidades foram dimensionadas para a intensidade total de TMSP-d₄ (referência interna). Espectros uni- e bidimensionais (RMN de ¹H, ¹³C, COSY ¹H-¹H, J-RESOLVED, HMBC ¹H-¹³C, HSQC ¹H-¹³C) foram verificados, objetivando a identificação e caracterização dos metabólitos. ¹H valores dos deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (*J*) em Hz. ¹³C

- deslocamentos químicos (ppm) verificados no experimento heteronuclear bidimensional determina as correlações diretas entre ^1H e ^{13}C . ^1H -COSY - espectroscopia de correlação homonuclear - determina correlações de acoplamento entre hidrogênios. Para efeito comparativo dos dados de metabolômica, foram realizadas análise quimiométrica pelo modo escalonado de intensidades, utilizando o *software* AMIX (versão 3.8 Bruker), com alinhamento de 30 espectros, resultando em 236 “buckets”. A análise de componentes principais (PCA) foi empregada a fim de identificar diferenças metabólicas entre os grupos de plantas infectadas ou não com *M. perniciosa* nos tempos avaliados.

3.15 Aplicação exógena de citocinina 6-benzil-adenina (BA)

A solução estoque de 6-benzil-adenina (BA) foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 1000 mM e, em seguida, foi diluída em lanolina aquecida a 55 °C na proporção 99:1 (lanolina:DMSO), com concentração trabalho de 20 mM. Plantas MT foram aplicadas 12 μL de 20 mM BA com o auxílio de uma micropipeta no ápice caulinar e nas gemas axilares do primeiro par de folhas, no tempo 0 e 10 dias após a primeira aplicação. Plantas MT controle foram aplicadas com 12 μL de solução de lanolina e DMSO na mesma proporção. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado ($n=6$).

3.16 Translocação de ^{14}C glicose

Inicialmente, foi realizado um experimento prévio de translocação de ^{14}C glicose em plantas MT não infectadas e infectadas por *M. perniciosa* com seis replicatas biológicas nos tempos 4, 10 e 20 DAI (dados não mostrados). No primeiro experimento, plantas MT inoculadas com *M. perniciosa* e não inoculadas, e as linhas transgênicas *At35S::CKX2* inoculadas e não inoculadas, foram coletadas nos tempos de 4, 10 e 20 DAI com *M. perniciosa*. Em um segundo experimento, plantas MT aplicadas com 12 μL de benziladenina (BA), na concentração de 20 mM, e plantas controle foram coletadas nos tempos de 5, 10 e 20 dias após aplicação (DAA). Para ambos os experimentos, foi realizado o ensaio de translocação de ^{14}C glicose, como descrito a seguir.

O volume de 10 μL de solução de ^{14}C -glicose (18.755 disintegrations min^{-1} (dpm) μL^{-1}) foi aplicado à primeira folha verdadeira de cada planta (abaixo do local da inoculação), e as plantas foram mantidas à temperatura ambiente por 6 h. Em seguida, a folha aplicada com ^{14}C -glicose de cada planta foi destacada e lavada em 2,5 mL de água destilada. Uma alíquota de 100 mL da lavagem resultante foi acrescentada a 10 mL de tampão de cintilografia líquida e submetida à análise de espectrometria de cintilografia líquida.

As raízes das plantas foram lavadas com água, para retirada de substrato aderido. Para as análises de autorradiografia, as plantas foram aderidas a um papel sulfite, colocadas em estufa para secagem a 50°C por 72 h, expostas a um filme de raio-X e visualizadas por scanner (Cyclone Plus, Perkin Elmer, Shelton, EUA). Posteriormente, as plantas foram divididas em órgãos e pesadas. Cada parte da planta foi então submetida a um oxidador biológico (Biological Oxidizer OX500) e $^{14}\text{CO}_2$ resultante foi fixado em solução cintiladora e quantificado utilizando espectrometria de cintilação líquida (*Liquid Scintillation Analyser* 1600 TR; Packard Canberra Company, Ramsey, EUA). A partir dos resultados, dois tipos de análises foram realizados: análise de radioatividade translocada (%) (dados não mostrados) e análise de radioatividade específica (dpm mg^{-1}). Na primeira, foi calculada a ^{14}C -glicose absorvida por cada parte da planta, através da relação do resultado da subtração entre a quantidade aplicada à folha e o excedente da lavagem da folha com água com o resultado em dpm da oxidação de cada parte da planta. Na segunda análise, foi calculada a relação entre o resultado em dpm da oxidação e o peso específico de cada órgão da planta. Os resultados foram analisados por teste *t*, com diferença significativa a 5%, utilizando o software R x64.3.3.1.

3.17 Tratamento com sacarose em plantas MT

A solução estoque de sacarose foi preparada em água deionizada estéril na concentração de 1000 mM e, em seguida diluída em Tween 20 (1%) na proporção 1000:1 (água:Tween 20). Plantas MT foram inoculadas com *M. pernicioso* como descrito em 3.4. Inicialmente, um experimento teste foi realizado com as concentrações de sacarose a 0,5 M e 1 M utilizando duas metodologias de aplicação: com o uso da micropipeta e via “spray” nas folhas (dados não mostrados). No segundo experimento, plantas inoculadas ou não com *M. pernicioso* receberam 50 μL de solução de 1 M sacarose com o auxílio de uma micropipeta no ápice caulinar e meristemas axilares o primeiro par de folhas todos os dias, desde 2 DAI até 34 DAI. Plantas controle foram tratadas com solução *mock* na proporção 1000:1:1 (água: Tween 20: EtOH). As plantas foram avaliadas para altura (cm) e diâmetro do caule (mm) na altura do primeiro par de folhas verdadeiras mais velhas, utilizando um paquímetro, nos tempos 5, 15, 25 e 35 DAI. O número de folhas no eixo principal antes da primeira inflorescência foi avaliado aos 25 DAI. O número de flores em antese e o número de frutos em desenvolvimento foram avaliados desde 11 DAI até 20 DAI e aos 40 DAI. A massa seca (g) de caules, raízes, folhas, pecíolos e frutos e o comprimento (cm) de raízes foram avaliados aos 40 DAI. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado

(3 parcelas com 5 plantas; $n=5$). Os resultados foram submetidos à ANOVA, com diferença significativa a 5%, seguido do teste de Tukey, utilizando o software R x64.3.3.1. Foram realizados os testes de verificação das pressuposições da ANOVA, como de homogeneidade de variância entre os tratamentos, por meio do teste Levene e normalidade dos resíduos, por meio do teste Shapiro-Wilk, utilizando o software R x64.3.3.1. As análises de potencial hídrico foram realizadas como descrito em. Três plantas de cada tratamento foram coletadas para cortes histológicos.

3.18 Cortes histológicos

Foram empregadas amostras de plantas MT inoculadas ou não com *M. pernicioso* e tratadas ou não com sacarose como descrito acima. Plantas inoculadas com *M. pernicioso* e não inoculadas, tratadas com sacarose e com solução *mock* ($n=3$) foram coletadas aos 35 DAI. Regiões do caule com engrossamento (sintoma) foram seccionadas e submetidas a cortes histológicos no micrótomo de deslize (SM200R, Leica). Os cortes foram clareados em solução 50% NaOH comercial e corados em solução 0,05% azul de toluidina. Em seguida, os cortes foram observados e fotografados sob lupa (S8AP0, Leica, Heidelberg, Alemanha) e microscópio óptico (LMD CTR 6500, Leica).

3.19 Desenho dos iniciadores

Os iniciadores para detecção específica dos genes selecionados foram desenhados utilizando o programa *Primer3* (Tabela 2) e a estabilidade dos iniciadores, para a formação de grampos e dímeros, foi verificada pelo programa *NetPrimer* (<https://www.premierbiosoft.com/netprimer/>).

Tabela 2 - Lista de genes de tomateiro associados ao metabolismo de açúcar, sequência dos iniciadores e o número de acesso

Gene	Iniciadores (5'-3')	Acesso
Cell wall invertase (<i>SlWiv-1(lin6)</i>)	ATCAAGCCCGATAACAATCCA CCTCACACTCCCAACCAATACTC	Solyc10g083290.3
Vacuolar invertase (<i>SITIV1</i>)	GTCAAGGACTTTAGAGACCCGA GCAGCACTCCATCCAATAGC	Solyc03g083910.2.1
Sucrose transport protein (<i>SISUT2</i>)	TTCTGCTCCTCTCTGGATAGTC GTCTGGTCTCTGTTCTTCATTCTT	Solyc05g007190.2
Trehalose phosphate synthase (<i>SITPS1</i>)	GCCTATTCATCATCTGGACCGTTCT AAGTTATGCCTGTGGCGTTTTTCTC	Solyc07g062140.3
Sucrose transport protein (<i>SISUT1</i>)	CAAAAGACGAGGAAGAAGAAGAA GAAAACAACACTACACATACCCCAT	Solyc11g017010.2
Sugar transporter protein (<i>SISTP1</i>)	CCTTGTTGCTTCTCTGGTGGC AGTGCTCCTCTGTATTTGTATGGT	Solyc02g079220.3

3.20 Extração de RNA

Ápices caulinares, caules com sintomas e pecíolos de plantas MT inoculadas ou não inoculadas *M. perniciosa*, tratadas com sacarose ou com solução *mock* foram coletados em quintuplicatas biológicas e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Após o congelamento, o tecido vegetal foi moído em moinho criogênico (Cryo Mill, Retsch, Haam, Alemanha) para maceração homogênea. O RNA total foi extraído baseado no protocolo de Trizol (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. O tecido macerado foi transferido para um tubo de centrífuga de 2 mL adicionado com de 1 mL de Trizol, seguido da em vórtex. Após a homogeneização, o tecido foi incubado à temperatura ambiente por 15 min, sendo homogeneizado a cada 2 min. Em seguida, o volume de 200 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) foi adicionado ao tubo, homogeneizado e incubado à temperatura ambiente por 15 min. O conteúdo foi centrifugado a 9.000 g por 15 min a 4°C. A fase superior foi coletada para um novo microtubo e foram adicionados 800 µL de isopropanol, seguido de centrifugação a 9.000 g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o volume de 500 µL de isopropanol foi adicionado e centrifugado a 9.000 g por 15 min. O pellet foi lavado duas vezes com etanol 70%, centrifugado 9.000 g por 6 min a 4°C e ressuspenso em 20 µL de água DEPC e armazenados a -80 °C.

Após a quantificação, cerca de 2 µg do RNA extraído de cada amostra foi tratado com a enzima DNase I (Fermentas), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, foi realizada a síntese de cDNA utilizando a enzima *RevertAid Premium Reverse* (Fermentas) para a transcrição reversa, seguindo as especificações do fabricante. 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 em uma reação de volume final 20 µL, contendo tampão da enzima 5X RT Buffer (Fermentas), 200 U de *RevertAid Premium Reverse* (Fermentas) e 20 U de *Ribolock RNase Inhibitor* (Fermentas). A reação de transcrição reversa foi incubada a 50°C por 30 min, 85°C por 5 min e armazenada a -20°C. A qualidade da síntese foi verificada por uma reação de RT-PCR, utilizando par de iniciadores de genes referência.

3.21 Análise da expressão de genes via RT-qPCR

Genes associados ao metabolismo de açúcar (Tabela 2) foram analisados para expressão gênica em plantas MT inoculadas ou não com *M. perniciosa*, tratadas com sacarose ou com solução *mock* em quintuplicatas biológicas. As reações de amplificação foram realizadas no volume final de 10 µL utilizando-se 1 µl de cDNA diluído 1:10; 0,5 µM dos iniciadores gene-específicos e 5 µl de *Platinum SYBR-green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen). As amplificações foram conduzidas em 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 um *pool* de amostras de RNA tratado com DNase. As reações de RT-qPCR foram conduzidas no sistema de RotorGene-3000 (Corbett Research). Para a normalização dos dados foi utilizado o gene de referência tubulina: AACCTCCATTCAGGAGATGTTT e TCTGCTGTAGCATCCTGGTATT (Deganello et al., 2014). Os valores de C_T (*Threshold cycle*) foram determinados pelo equipamento e os valores de *fold change* de cada gene foram calculados utilizando a equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak; Schmittgen, 2001). Os valores de ΔC_T foram submetidos à análise estatística por teste t, com diferença significativa a 5%, utilizando o software R x64.3.3.1

3.22 Avaliação de mutantes de florescimento e senescência

Os mutantes *sft*, *lutescent*, *green flesh* e a linha transgênia 35S::*SFT* foram inoculadas com *M. perniciosa* como descrito acima. As plantas foram avaliadas para altura e diâmetro do caule na altura do primeiro par de folhas verdadeiras, utilizando um paquímetro, nos tempos 5, 15, 25 e 35 DAI. O número de folhas no eixo principal antes da primeira inflorescência foi avaliado aos 25 DAI. O número de flores em antese foi avaliado desde 11 DAI até 27 DAI.

O número de frutos em desenvolvimento foi avaliado desde os 15 DAI até 20 DAI e aos 40 DAI. A massa seca (g) de caules, raízes e frutos e o comprimento (cm) de raízes foram avaliados aos 40 DAI. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (3 parcelas com 5 plantas; $n=5$). Os resultados foram submetidos à ANOVA, com diferença significativa a 5%, seguido do teste de Tukey, utilizando o *software* R x64.3.3.1. Foram realizados os testes de verificação das pressuposições da ANOVA, como de homogeneidade de variância entre os tratamentos, por meio do teste Levene e normalidade dos resíduos, por meio do teste Shapiro-Wilk, utilizando o *software* R x64.3.3.1. Para os dados que não cumpriram as pressuposições da ANOVA, foram realizados os testes Kruskal e Pairwise.wilcox, utilizando o *software* R x64.3.3.1.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos sintomas da inoculação com *M. perniciosa* em MT

A inoculação da região do ápice caulinar de plantas MT com um isolado do biótipo-S de *M. perniciosa* em plantas MT promoveu a formação dos primeiros sintomas visíveis da infecção, como engrossamento do caule e pecíolos e perda de dominância apical, visíveis aos 10 dias após inoculação (DAI) (Figura 4). A intensidade do engrossamento do caule de plantas MT infectadas progrediu durante o tempo; no entanto, não foi possível observar a necrose de tecidos infectados em MT (Figura 4; Deganello et al., 2014; Costa, 2017), como reportado em cacauero infectado por *M. perniciosa* biótipo-C, aos 60 DAI (Barau et al., 2014), e mesmo outras cultivares de tomateiro (Marelli et al., 2009). Os sintomas de engrossamento de caule e pecíolos, indução de clorose na folha adjacente à região de engrossamento do caule, engrossamento de pecíolos nas folhas mais expandidas, próximas à região de sintoma no caule, engrossamento de pedúnculo floral, em geral resultante da formação da primeira inflorescência (Figura 5), e redução de raízes (Figura 6) também foram observados nas nossas inoculações.

Os sintomas característicos da infecção de *M. perniciosa*, como alteração do diâmetro do caule (mm) e da altura das plantas (cm), foram avaliados aos 5, 15, 25 e 35 DAI em 15 plantas MT infectadas em comparação a 15 plantas MT não inoculadas (Figura 7). Plantas MT infectadas por *M. perniciosa* apresentaram aumento significativo na média do diâmetro do caule em relação as não infectadas aos 15, 25 e 35 DAI (Figura 7B), corroborando os resultados obtidos por Deganello et al. (2014) e Costa (2017).

Além disso, aos 40 DAI, a biomassa da região sintomática do caule com comprimento de 3 cm de caule desde o par de folhas mais expandidas até o terceiro par de folhas mais expandidas, e das raízes de plantas infectadas, foram comparadas à biomassa das mesmas regiões em plantas não infectadas (Figura 8). A região engrossada dos caules de plantas MT infectadas apresentou média de massa seca significativamente maior em relação à mesma região nos caules de plantas não infectadas (Figura 8A). No entanto, a biomassa da região de caule sem sintomas de plantas infectadas e não infectadas não apresentaram diferença significativa (Figura 8B).

A infecção por *M. perniciosa* alterou o sistema radicular de plantas infectadas, com redução na massa seca em relação a plantas não infectadas (Figura 8C). No entanto, o comprimento de raízes de plantas infectadas foi similar ao de plantas não infectadas

(Figura 8D). Possivelmente, a infecção por *M. pernicioso* afete o desenvolvimento de raízes laterais, mas não da raiz principal. Portanto, a alteração na biomassa de raízes de plantas MT infectadas por *M. pernicioso* poderia resultar na diminuição da absorção de água, prejudicando o balanço hídrico e, conseqüentemente, o metabolismo dessas plantas.

Figura 4 - Representação de plantas MT não infectadas (painel superior) ou inoculadas com *M. pernicioso* (painel inferior) aos 5, 15, 25, 35, 60 e 90 DAI

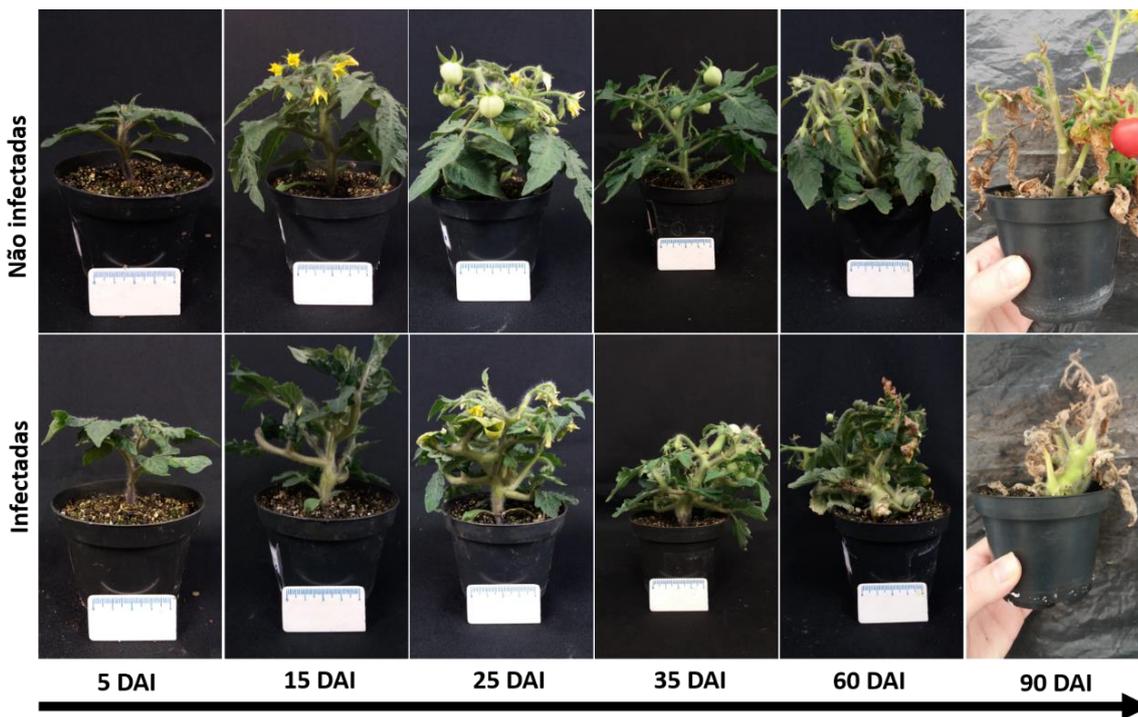


Figura 5 - Representação dos sintomas da infecção por *M. pernicioso* em MT. A) engrossamento do caule, pecíolos e perda de dominância apical, B) clorose na folha, C) engrossamento do pecíolo e nervuras e encarquilhamento da folha e D) engrossamento pedúnculo floral

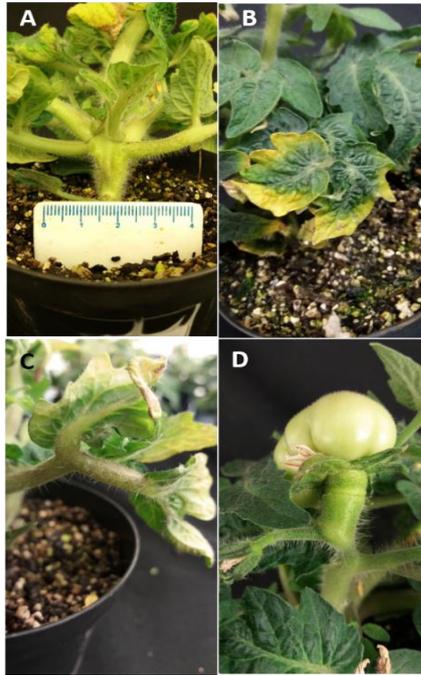


Figura 6 - Representação de raízes de planta MT infectada por *M. pernicioso* (à esquerda) em comparação com planta MT não infectada (à direita), aos 20 DAI



Figura 7 - Avaliação de sintomas da inoculação de MT com *M. pernicioso* no tempo. A) altura e B) diâmetro de plantas MT infectadas por *M. pernicioso* aos 5, 15, 25 e 35 DAI. Círculos preenchidos representam plantas não infectadas e círculos abertos representam plantas infectadas por *M. pernicioso*. Médias \pm erro padrão ($n=15$). Médias dos tratamentos seguidas por asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste t ($p \leq 0.05$)

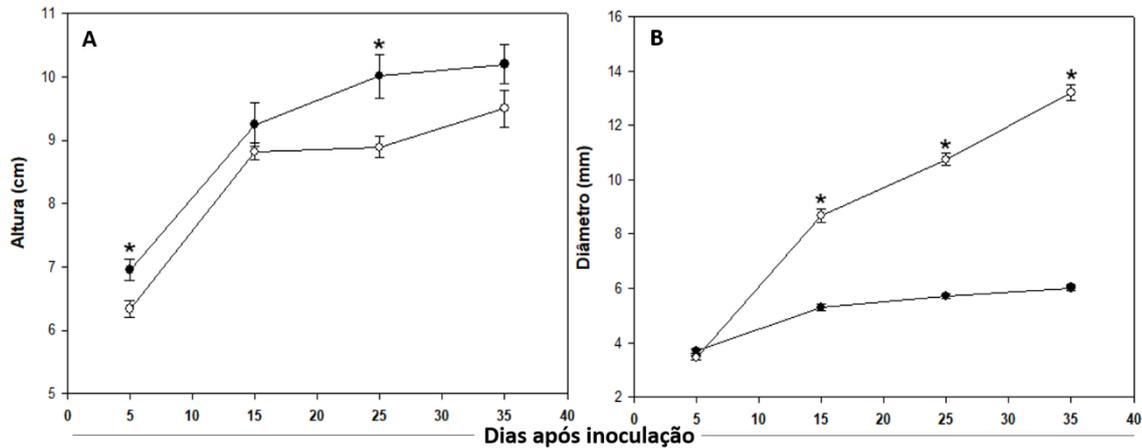
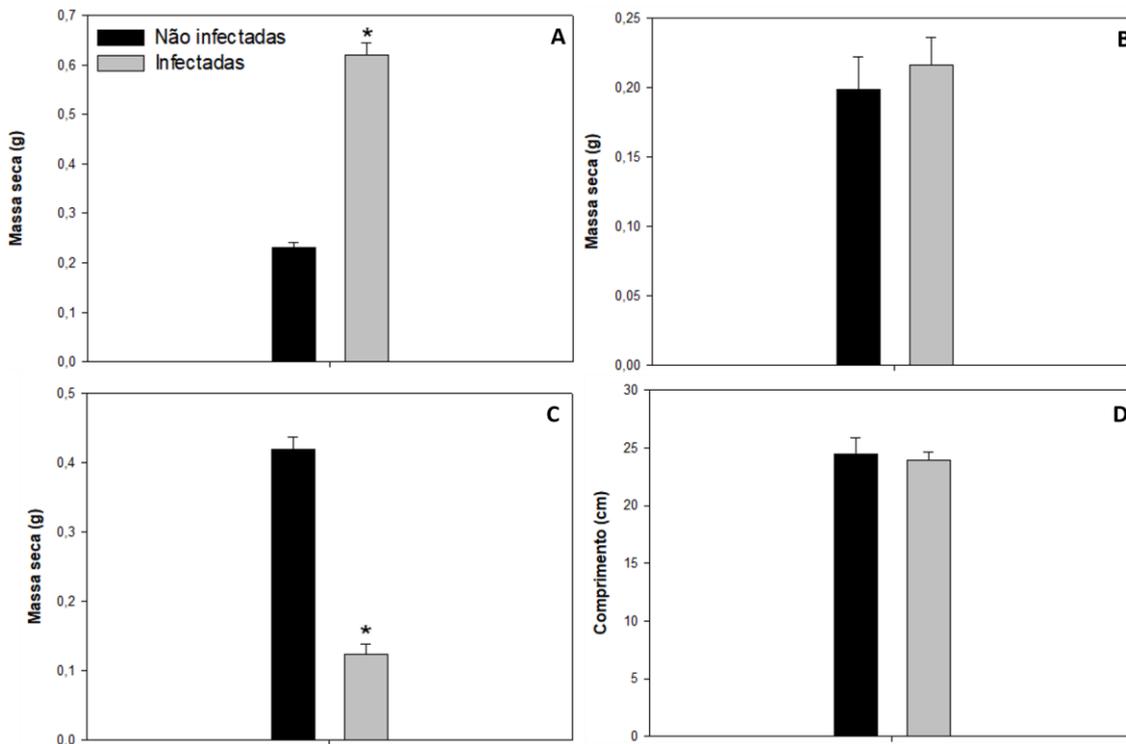


Figura 8 - Avaliação de sintomas no caule e raízes de MT com a infecção por *M. pernicioso*. A) Massa seca (g) de região de sintomas no caule (3 cm) B) massa seca (g) de caule sem sintomas, C) comprimento (cm) de raízes e D) massa seca (g) de raízes de plantas não infectadas e infectadas por *M. pernicioso* aos 40 DAI. Barras representam médias \pm erro padrão ($n=10$). Médias dos tratamentos seguidas por asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste t ($p \leq 0.05$)



Além disso, foi avaliada, de forma exploratória, a infecção de frutos de MT pelo biótipo-S de *M. perniciosa* sem replicatas biológicas ou rigor estatístico (Figura 9). A inoculação com *M. perniciosa* de um fruto proveniente de planta MT não infectada (Figura 9B) e dois frutos de plantas MT infectadas por *M. perniciosa* (Figura 9C) apresentaram o mesmo fenótipo de necrose, sintoma típico da infecção pelo biótipo-C de *M. perniciosa* em frutos de cacaueteiro em desenvolvimento (Purdy & Schmidt, 1996). Dois frutos de plantas MT não infectadas, inoculados com água-água, foram utilizados como controle (Figura 9A).

Figura 9 - Inoculação de frutos de MT com *M. perniciosa*. A) fruto de MT controle não inoculado, B) fruto proveniente de MT controle, posteriormente inoculado com *M. perniciosa* C) frutos provenientes de MT infectados, posteriormente inoculados com *M. perniciosa*



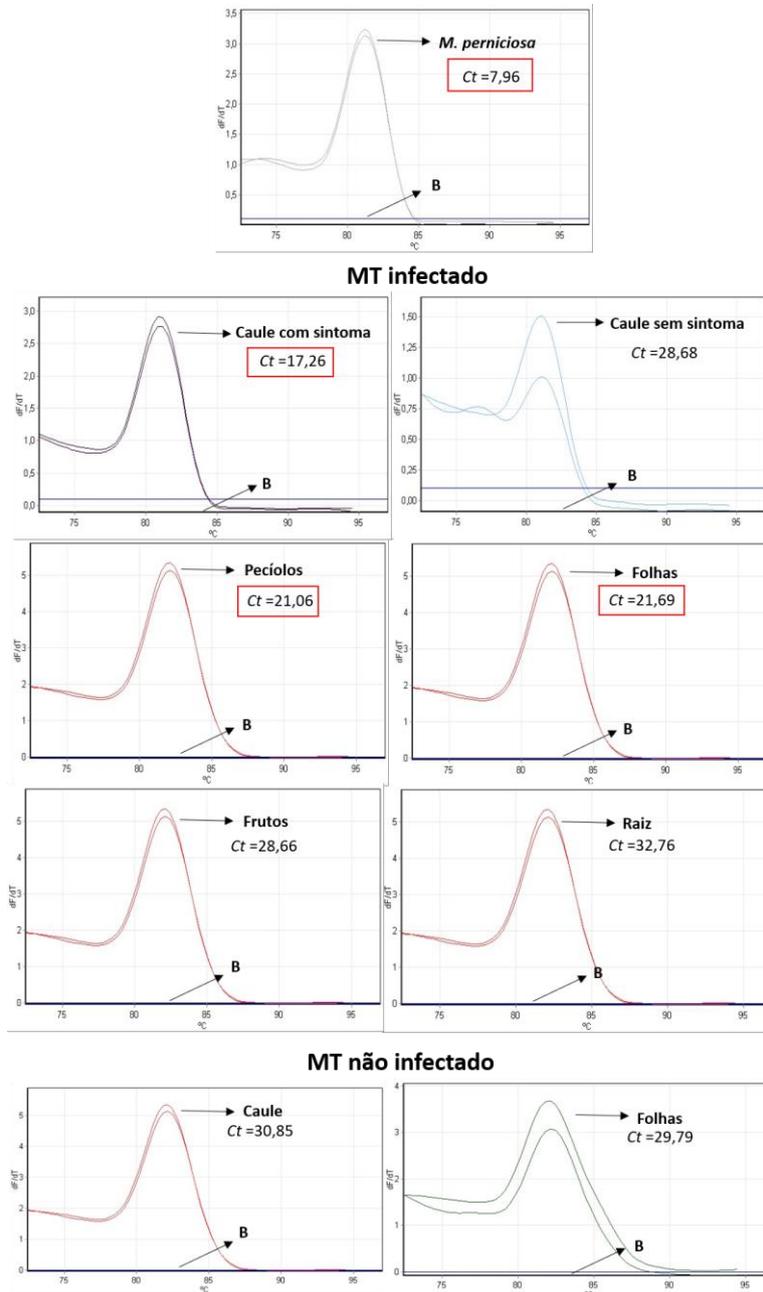
4.2 Detecção de *M. perniciosa* em MT

A despeito da presença de *M. perniciosa* em baixas densidades no apoplasto de cacaueteiro (Penman et al., 2000; Sena et al., 2014) e MT (Deganello et al., 2014), a infecção por esse fungo é caracterizada por alterações bioquímicas e fisiológicas expressivas. Com o objetivo de detectar a presença do micélio de *M. perniciosa* biótipo-S nos órgãos de plantas MT inoculadas, foi realizada a amplificação quantitativa da região espaçadora interna do gene ribossomal *ITS* (Schena et al., 2004) empregando iniciadores específicos para *M. perniciosa* (Gareth Griffith, comunicação pessoal). Três replicatas biológicas de plantas MT inoculadas ou não com *M. perniciosa* aos 40 DAI, foram coletadas e separadas em caule com sintomas e caule sem sintomas (somente para plantas infectadas), raiz, pecíolos, folhas e frutos.

Como controle, três replicatas biológicas do micélio dicariótico do isolado Tiradentes de *M. pernicioso* biótipo-S foram avaliadas.

Foi possível observar a amplificação da região *ITS* do biótipo-S no micélio de *M. pernicioso* (controle positivo), no caule com sintoma, pecíolos e folhas de plantas MT inoculadas (Figura 10). Em outras regiões das plantas MT inoculadas, como caule sem sintomas, frutos e raízes, não foi possível verificar a amplificação da região *ITS*, uma vez que os valores de *Ct* se apresentaram tardios, próximo aos valores *Ct* de plantas não inoculadas (Figura 10). Esses resultados correlacionam com a colonização limitada durante a infecção de *M. pernicioso* biótipo-S em MT (Deganello et al., 2014). Portanto, é possível sugerir que sintomas como diminuição de raízes e aumento no número de lóculos de frutos decorrentes da infecção por *M. pernicioso* (Costa, 2017), ocorram devido a uma alteração no balanço hormonal (Gordon et al., 2009; Ioio et al., 2008), sobretudo pelo efeito dos hormônios citocinina e auxina (Costa, 2017), mas não pela presença do fungo nessas regiões.

Figura 10 - Curva de dissociação do produto de qPCR da região espaçadora interna do gene ribossomal *ITS* em amostras de *M. perniciosa* cultivado *in vitro*, amostras de caule com sintoma, caule sem sintoma, pecíolos, folhas, frutos e raiz de plantas MT inoculadas com *M. perniciosa* e amostras de caule e folhas plantas MT controle não inoculadas. B significa controle negativo (sem cDNA). Valores de *Ct* estão representados em cada gráfico



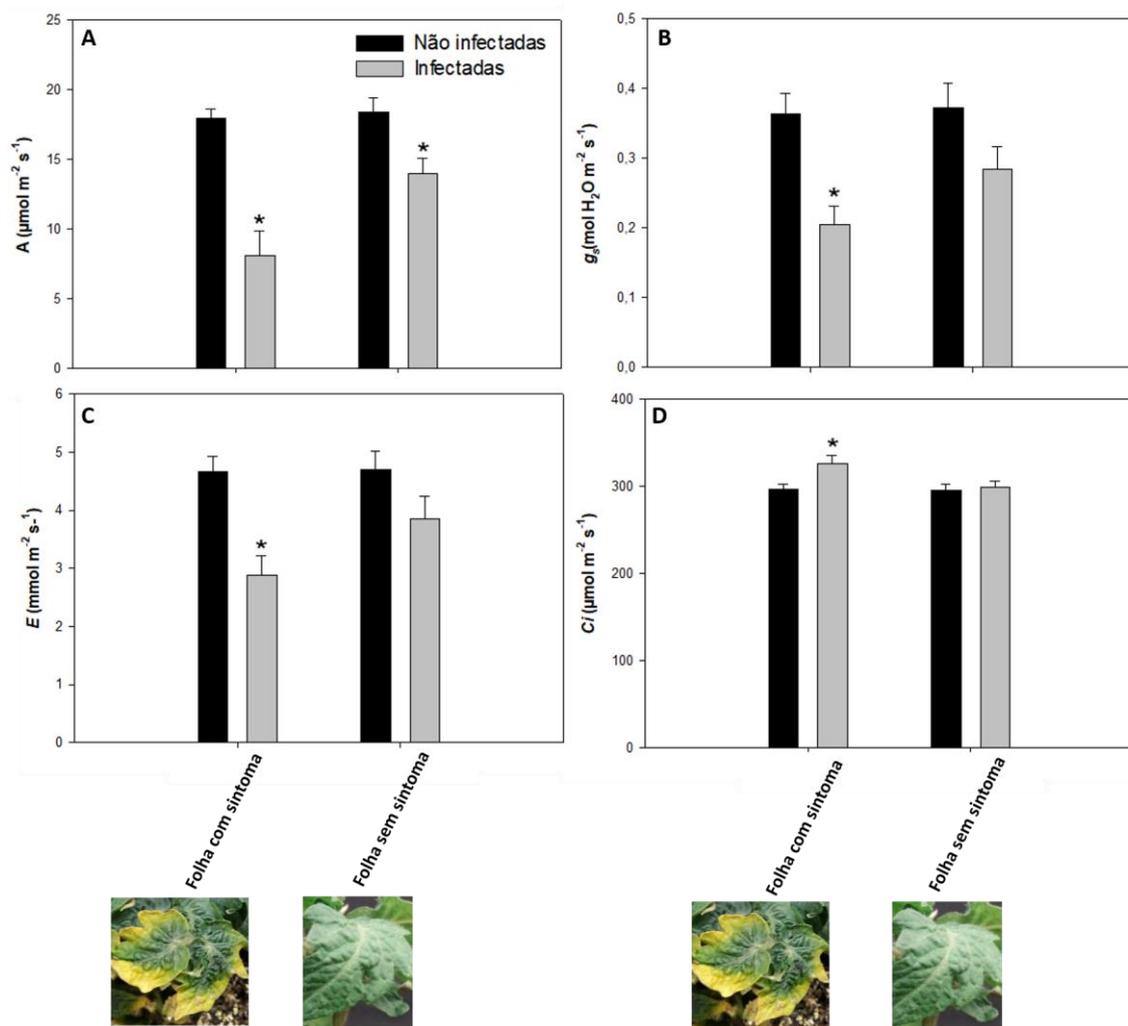
4.3 Caracterização fisiológica da infecção de tomateiro MT por *M. perniciosa*

Para verificar se a inoculação com *M. perniciosa* altera as taxas fotossintéticas de folhas em MT, foram analisadas as trocas gasosas de folhas sem sintomas (não cloróticas) e folhas com sintomas (cloróticas e encarquilhadas) de plantas inoculadas com *M. perniciosa* aos 25 DAI. A infecção por *M. perniciosa* levou à redução na taxa fotossintética (A)

em folhas com sintoma (clorótica e encarquilhada) e sem sintoma (não clorótica), comparando com folhas na mesma posição e estágio de desenvolvimento em plantas MT não infectadas (Figura 11A). A condutância estomática (g_s) foi reduzida em folhas com sintomas (clorótica e encarquilhada) de plantas MT infectadas, mas não em folhas sem sintomas (não clorótica), quando comparando a folhas de plantas MT não infectadas (Figura 11B). Como consequência do fechamento de estômatos, também foi observada uma redução na taxa transpiratória (E) em folhas com sintomas (clorótica e encarquilhada) de plantas infectadas (Figura 11C). Em contraste, a concentração de CO_2 intercelular (C_i) foi maior em folhas com sintomas (clorótica e encarquilhada) de plantas MT infectadas por *M. pernicioso*, em relação as folhas de plantas MT não infectadas (Figura 11D).

De modo geral, a infecção por *M. pernicioso* promoveu alterações na fotossíntese das plantas MT. O fechamento de estômatos poderia explicar, parcialmente, a redução na taxa fotossintética em folhas com sintomas de MT infectadas. No entanto, o aumento na concentração de CO_2 intercelular (C_i) em folhas com sintomas (clorótica e encarquilhada) sugere que a redução na taxa fotossintética (A) não foi somente consequência do fechamento de estômatos, mas também por uma limitação na fixação de carbono no Ciclo de Calvin, possivelmente pela inibição de enzimas do ciclo.

Figura 11 - Metabolismo fotossintético de plantas de MT com a infecção por *M. pernicioso*. A) taxa fotossintética (A); B) condutância estomática (g_s); C) taxa transpiratória (E) em folhas com sintomas (cloróticas) e sem sintomas (não cloróticas) na região do terceiro par de folhas mais velhas de plantas MT infectadas por *M. pernicioso* em comparação com folhas de plantas MT não infectadas correspondentes na mesma posição; e D) concentração de CO_2 intercelular (C_i), aos 25 DAI. Barras representam médias \pm erro padrão ($n=10$). Médias dos tratamentos seguidas por asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste t ($p \leq 0.05$), comparando folhas de plantas infectadas e seus respectivos controles

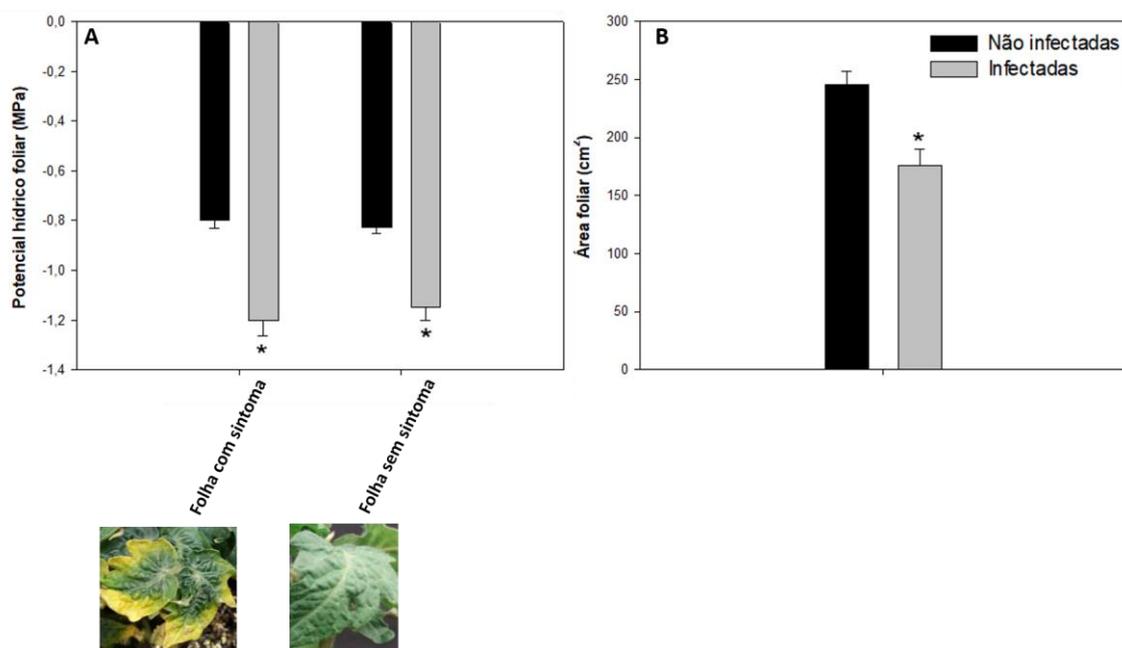


A regulação do potencial de água (Ψ_w) em plantas é importante não somente para as respostas das plantas à falta de água, mas também devido ao efeito do potencial hídrico em processos metabólicos, como o crescimento de tecidos através da expansão celular via turgescência (Kramer, 1983). As variáveis mais relevantes no *status* de água de plantas são a composição do xilema e o potencial hídrico de folhas (Kramer, 1988). Além disso, o tamanho relativo da área de absorção de água, definida pela raiz, e pela área da parte aérea, por onde a água é perdida, também são fatores significativos para o *status* de água de plantas (Berryman et al., 1991). Com o objetivo de verificar o efeito da infecção por *M. pernicioso* no *status* hídrico

das plantas MT e investigar se o fechamento de estômatos possa ser resultado do estresse hídrico, foram realizadas análises de potencial hídrico, condutância e condutividade hidráulica em plantas MT infectadas e não infectadas aos 35 DAI.

A inoculação com *M. perniciosa* em MT reduziu significativamente os valores de potencial hídrico tanto em folhas com sintoma (cloróticas e encarquilhadas) como sem sintoma (não cloróticas), em relação as plantas não infectadas (Figura 12A), refletindo o déficit de água em folhas em decorrência da infecção. A média de área foliar total de plantas MT infectadas por *M. perniciosa* também foi menor em relação às plantas não infectadas (Figura 12B).

Figura 12 - Parâmetros do status de água em MT pela infecção com *M. perniciosa*. A) potencial hídrico Ψ_w (MPa) de folhas com sintoma (cloróticas) e sem sintoma (não cloróticas) de plantas MT infectadas por *M. perniciosa* em relação a folhas na mesma região de plantas não infectadas aos 35 DAI e B) área foliar (cm^2) total de plantas MT infectadas por *M. perniciosa* e não infectadas aos 35 DAI. Barras representam médias \pm erro padrão ($n=10$). Médias dos tratamentos seguidas por asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste t ($p \leq 0.05$), comparando folhas de plantas infectadas e seus respectivos controles



Um estudo recente com respeito à regulação hormonal na interação *M. perniciosa* x MT demonstrou que a infecção de MT por *M. perniciosa* promove a hipertrofia e hiperplasia de células do xilema, floema e córtex, devido à indução dos hormônios citocinina e auxina (Costa, 2017). Para verificar se o aumento nos vasos do xilema na região de engrossamento do caule poderia favorecer a translocação de água nessa região, foram analisadas as atividades de condutância e condutividade hidráulica do caule na região de sintomas (caule engrossado) e na

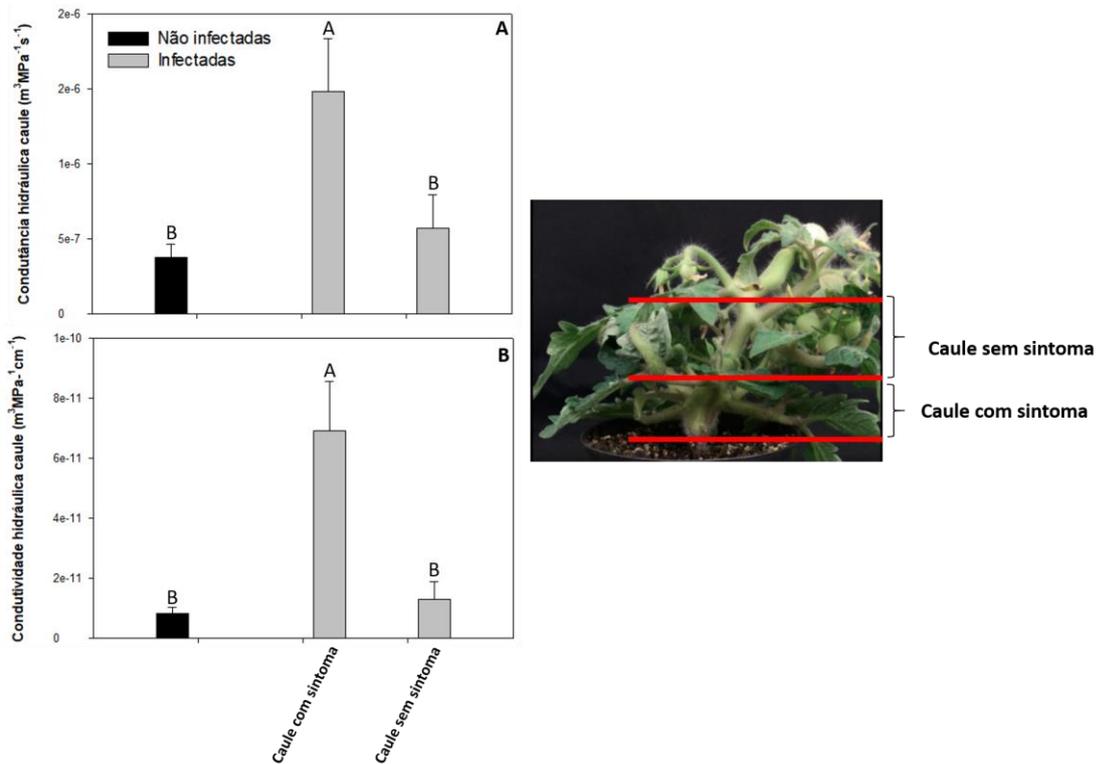
região superior do caule (caule não engrossado) em comparação com caules de plantas não infectadas aos 35 DAI (Figura 13).

A condutância hidráulica determina a quantidade de água translocada em uma área de caule em função do tempo, enquanto que a condutividade hidráulica determina a velocidade na qual um feixe de água é translocado transversalmente pelo comprimento do caule. O método de sucção utilizado para mensurar condutância e condutividade hidráulica foi otimizado a partir de uma proposta que visa aumentar a confiabilidade na estimativa dessas análises, aplicando tensões negativas nos trechos de caule analisados, similarmente ao que ocorre na transpiração de plantas em condições normais (Reis, 2013).

A infecção de MT por *M. pernicioso* aumentou as taxas de condutância hidráulica (Figura 13A) e condutividade hidráulica (Figura 13B) na região de engrossamento do caule, em relação à região sem sintoma, acima do engrossamento no caule de plantas infectadas, e em região análoga do caule de plantas não infectadas (Figura 13). Esses resultados indicam o aumento na quantidade e velocidade de água translocada em caules engrossados de plantas MT infectadas. No entanto, a região do caule não engrossada, acima do sintoma de engrossamento, apresentou taxas de quantidade e velocidade de água translocada similares aos caules de plantas MT não infectadas, sugerindo que a translocação aumentada de água ocorre majoritariamente para a região de infecção, mas desfavorecendo as partes acima da região de sintomas nas plantas infectadas.

Não obstante ao aumento na condutância e condutividade hidráulica na região de sintoma de caule (Figura 13), provavelmente devido ao aumento no número e volume de células do xilema (Costa, 2017), o potencial hídrico das folhas de plantas MT infectadas apresentou valores mais negativos em relação às plantas MT não infectadas (Figura 12). A redução no potencial hídrico foliar nas plantas MT infectadas em relação as não infectadas pode ter ocorrido devido à redução na captação de água pela raiz, a qual apresentou biomassa reduzida (Figura 8). Além disso, o aumento da condutividade e condutância hidráulica de caules de MT infectados na região de sintomas, com posterior diminuição na parte superior do caule (Figura 13), aponta para um dreno de água aumentado nessa região, desfavorecendo o transporte de água que vai para as folhas (Figura 12).

Figura 13 - Translocação de água na infecção de MT por *M. perniciosa*. A) condutância hidráulica ($\text{m}^3 \text{Mpa}^{-1} \text{s}^{-1}$) e B) condutividade hidráulica ($\text{m}^3 \text{Mpa}^{-1} \text{cm}^{-1}$) em caules com sintoma (região engrossada) e sem sintoma (região não engrossada) de plantas MT infectadas e caule de plantas MT não infectadas aos 35 DAI. Barras representam médias \pm erro padrão ($n=9$). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$)



4.4 Alteração no metabolismo de plantas MT decorrente da infecção por *M. perniciosa*

Para investigar alterações no metabolismo de plantas MT infectadas por *M. perniciosa*, foram utilizadas duas técnicas para a detecção de metabólitos, Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas com analisador por Tempo de Voo (GC-MS-TOF) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H RMN). O experimento utilizando GC-MS-TOF permitiu a detecção 54 metabólitos (Tabela 4; Anexo B) referentes ao metabolismo primário de caules de MT. Análise de componentes principais (PCA) foi realizada com a finalidade de identificar mudanças metabólicas em plantas MT infectadas e não infectadas nos tempos 4, 10 e 20 DAI com *M. perniciosa*. A análise das componentes principais PC1 x PC2 permitiu a separação dos tempos de coleta após a inoculação explicando 69,9% da variância (Figura 14). Por sua vez, as componentes PC3 x PC4 permitiram a separação dos tratamentos 'plantas infectadas' das 'não infectadas' com 13,1% de explicação de variância (Figura 15). Portanto, o tempo de vida das plantas MT explicou um efeito maior na alteração de metabólitos em comparação à infecção por *M. perniciosa*.

Figura 14 - Análise das componentes principais PC1 X PC2 de plantas MT inoculadas ou com por *M. perniciosa* nos tempos 4, 10 e 20 DAI, ($n=6$). Preto: 4 DAI não infectadas “MT_4_Cont_”, vermelho: 4 DAI infectadas “MT_4_Inoc_”, azul: 10 DAI não infectadas “MT_10_Cont_”, laranja: 10 DAI infectadas “MT_10_Inoc_”, verde: 20 DAI não infectadas “MT_20_Cont_” e rosa: 20 DAI infectadas “MT_20_Inoc_.”

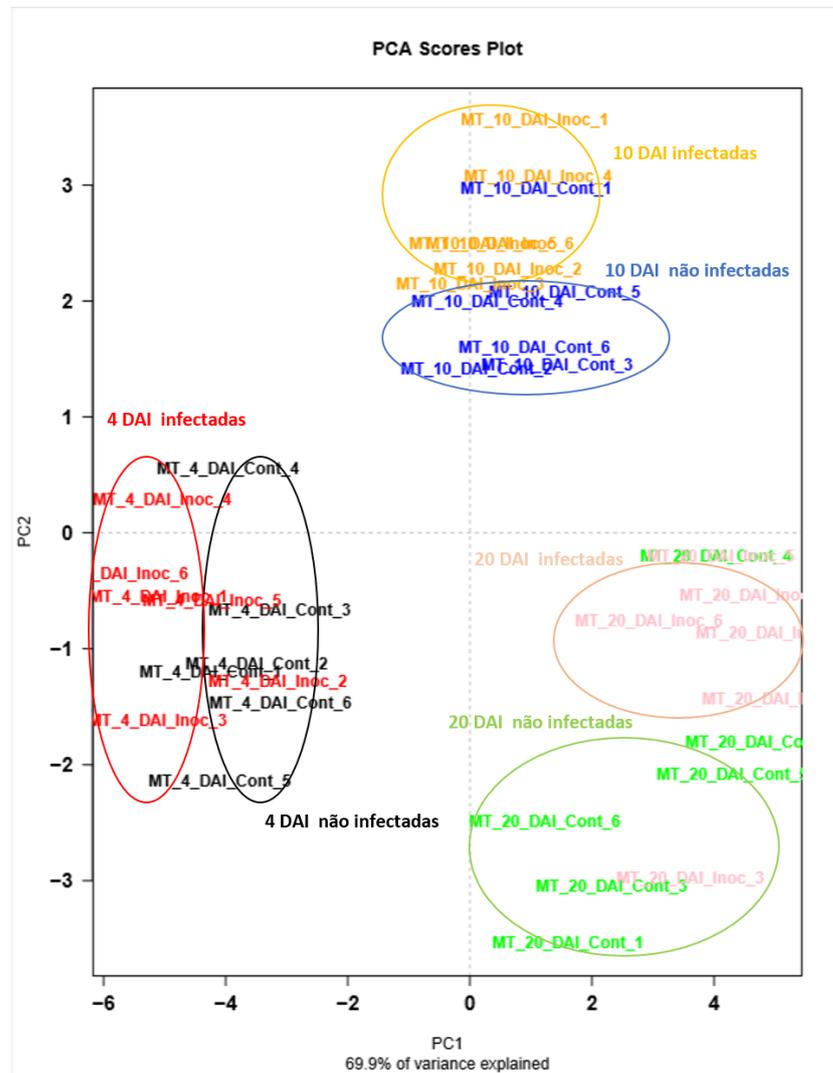
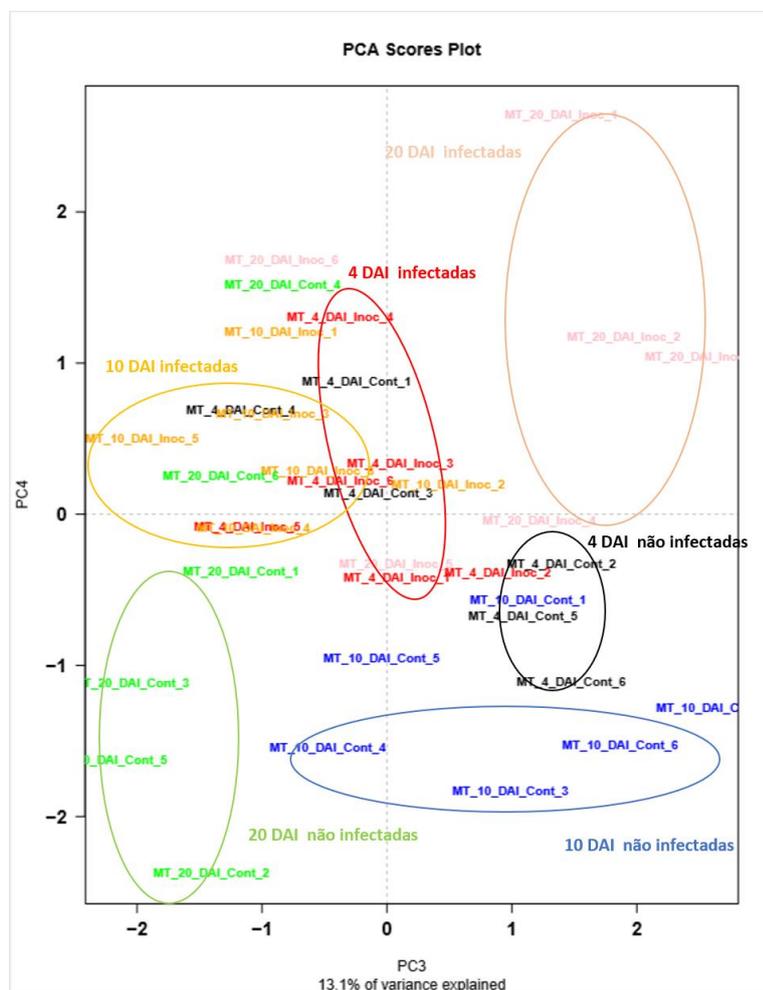


Figura 15 - Análise de componentes principais PC3 X PC4 de plantas MT inoculadas ou não com *M. perniciosa* nos tempos 4, 10 e 20 DAI, ($n=6$). Preto: 4 DAI não infectadas “MT_4_Cont_”, vermelho: 4 DAI infectadas “MT_4_Inoc_”, azul: 10 DAI não infectadas “MT_10_Cont_”, laranja: 10 DAI infectadas “MT_10_Inoc_”, verde: 20 DAI não infectadas “MT_20_Cont_” e rosa: 20 DAI infectadas “MT_20_Inoc_.”



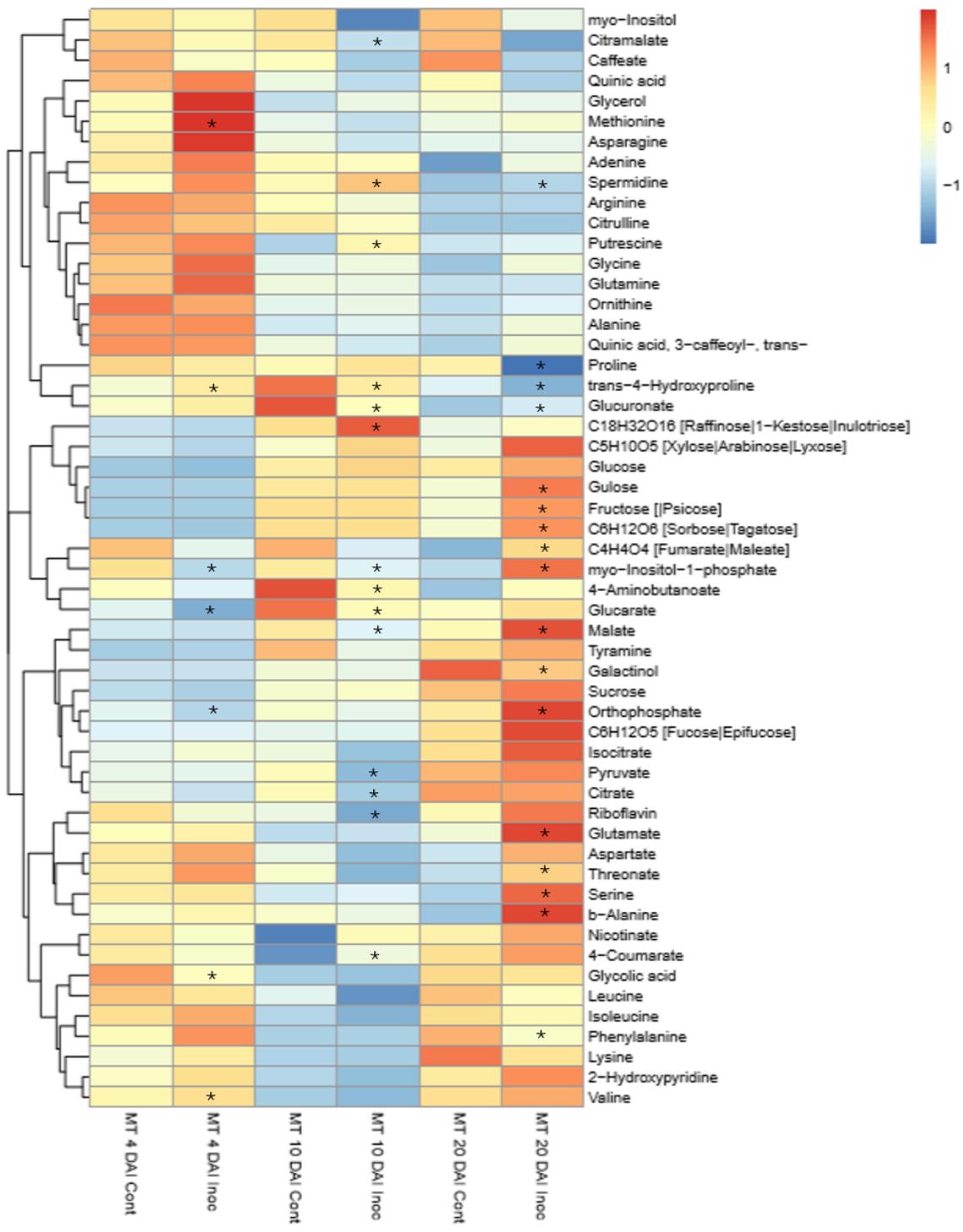
Dentre os metabólitos identificados, 28 foram significativamente diferentes pelo teste t ($p < 0,05$) quando comparando plantas MT infectadas e não infectadas no mesmo estágio de desenvolvimento, nos tempos 4, 10 e 20 DAI com *M. perniciosa* (Figura 16). De modo geral, a infecção por *M. perniciosa* induziu uma alteração no metabolismo primário em caules de plantas MT (Figura 16). No início da infecção, quando ainda não são observados os sintomas (4 DAI), foi revelada uma diminuição significativa de ácido glicólico, ácido glucárico, riboflavina, ortofosfato e mio-inositol-1-fosfato. Em contrapartida, os níveis de aminoácidos, como valina, metionina e trans-4-hidroxiprolina e de uma poliamina, a esperdimina, foram significativamente aumentados (Figura 16).

Aos 10 DAI, quando já é possível observar sintomas moderados da infecção, foi observada a diminuição dos ácidos orgânicos, como ácido málico, ácido fumárico e ácido cítrico e ácido pirúvico. Os ácidos glucurônico e glucárico, a riboflavina, o ortofosfato, o mio-inositol-1-fosfato, o citramalato e os aminoácidos não essenciais 4-ácido butanoico (GABA) e 4-trans-hidroxi-prolina também apresentaram níveis significativamente reduzidos. Além disso, foi observado o aumento significativo de poliaminas, como a putrescina e esperdimina, do 4-ácido coumárico e do açúcar rafinose (Figura 16).

Aos 20 DAI, os sintomas da infecção já são bem aparentes e distinguem efetivamente as plantas infectadas das não infectadas. Em contraste com o padrão observado em plantas infectadas aos 4 e 10 DAI, aos 20 DAI, plantas infectadas acumularam amino ácidos como a serina, ácido glutâmico e beta-alanina, ácidos orgânicos, como ácido málico e ácido fumárico, esperdimina, ortofosfato, mio-inositol-1- fosfato, os ácidos glucurônico, glucárico e treônico e os carboidratos gulose, sorbose/tagatose e frutose. Ao mesmo tempo, foi observada a diminuição dos aminoácidos prolina e fenilalanina e do carboidrato galactinol (Figura 16).

A acumulação de ácidos orgânicos do ciclo TCA em plantas infectadas aos 20 DAI demonstram um aumento no metabolismo respiratório, sugerindo o fornecimento de energia para sustentar a formação de um possível dreno ou o crescimento do patógeno na região de sintomas. O acúmulo de frutose e poliaminas também sustenta essa hipótese. Por *feedback* negativo, um aumento na necessidade energética de plantas MT infectadas poderia afetar negativamente o acúmulo sacarose (Schaker et al., 2017), uma vez que parte dos açúcares possa estar envolvida na geração de energia (López-Gresa et al., 2010). No entanto, não foi observada alterações significativas nos níveis de sacarose e glicose em plantas infectadas, somente de frutose.

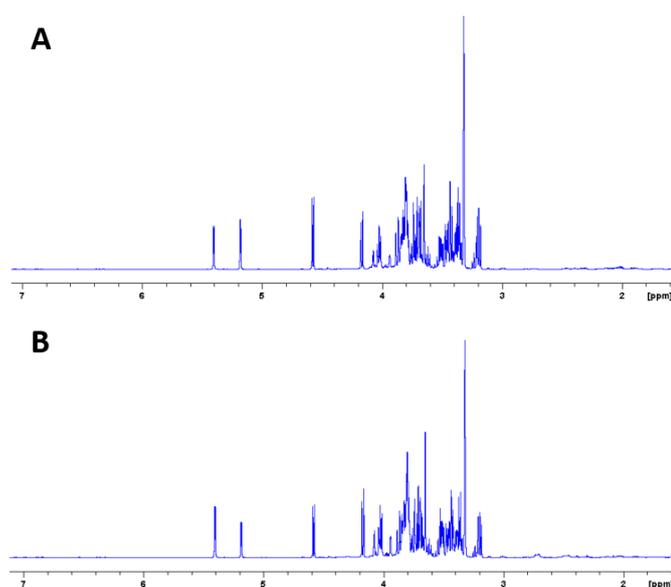
Figura 16 - *Heatmap* de metabólitos em plantas MT inoculadas ou não com *M. pernicioso* nos tempos 4, 10 e 20 DAI obtidos através de GC-MS-TOF. A escala (z-score) azul indica baixas concentrações em plantas infectadas e a escala vermelha indica altas concentrações em plantas infectadas ($n=6$). “*” indicam metabólitos significativamente diferentes por teste t ($p<0,05$) em plantas MT infectadas em comparação com não infectadas no mesmo tempo



A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi utilizada para verificar alterações de metabólitos em caules de plantas MT infectadas por *M. pernicioso* nos tempos 4, 10, 20 e 30 DAI. Foram identificados 34 metabólitos utilizando a técnica RMN 1D e 2D (uni e bidimensional) como ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{13}C HMBC, por meio da comparação de deslocamentos químicos (ppm) e constante de acoplamento (Hz) de sinais referentes de hidrogênios de compostos orgânicos presentes nas amostras analisadas a compostos de referência (Tabela 3; Anexo A). No espectro de RMN de ^1H de plantas MT inoculadas com *M. pernicioso* foram identificados aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, álcool açúcares, nucleosídeos, além de alguns metabólitos secundários (Tabela 3; Anexo A); Figura 17).

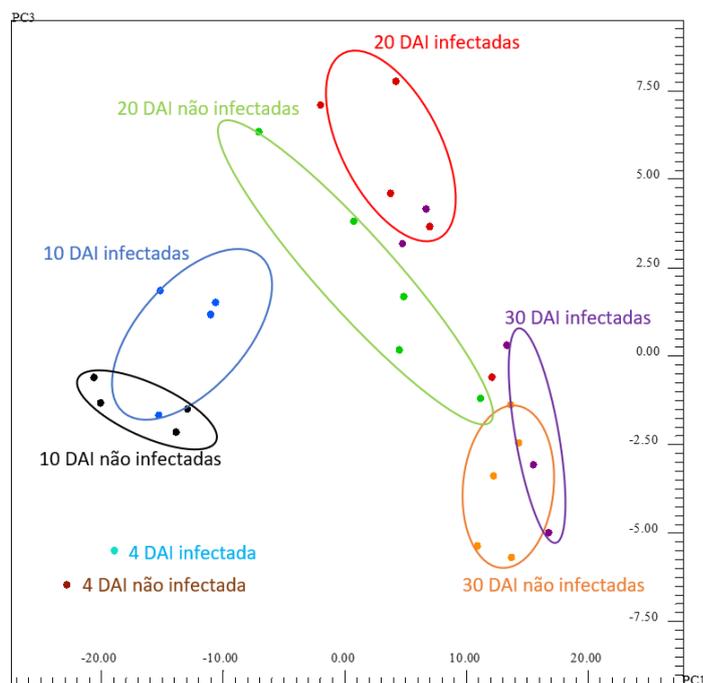
Análise multivariada foi utilizada para selecionar ressonâncias de RMN de ^1H alteradas em função da infecção de plantas MT com *M. pernicioso* nos tempos 4, 10, 20 e 30 DAI. Dentre as análises multivariadas, a análise de componentes principais (PCA), na qual a separação é alcançada a partir da variação imparcial máxima entre as amostras (Abdel-Farid et al., 2009), foi escolhida, para verificar tendências e identificar possíveis alterações metabólicas após a infecção nas plantas MT. Além disso, a utilização do gráfico de pesos permitiu identificar compostos responsáveis pela separação dos grupos de amostras no gráfico das componentes principais.

Figura 17 - Espectros de ^1H RMN 600 MHz representando plantas A) MT não infectadas e B) MT infectadas por *M. pernicioso* aos 30 DAI



As componentes principais PC1 X PC3 apresentaram uma separação dos tempos de coleta, 4, 10, 20 e 30 DAI, com as componentes PC1 x PC3 explicando 86,27% de variância no gráfico de escores (Figura 18). Já as componentes as componentes PC2 x PC3 permitiram a separação das amostras de plantas infectadas nos tempos 10, 20 e 30 DAI (componente PC2 negativa) em relação aos seus respectivos controles com 16% de variância explicada (Figura 19). No gráfico de pesos para as componentes PC2 x PC3, a separação das plantas MT infectadas aos 10, 20 e 30 DAI em relação ao controle foram correlacionadas aos sinais referentes aos aminoácidos glicina, glutamato e aspartato, aos nucleosídeos uridina e adenosina e aos metabólitos relacionados à via da glicólise, UDP-glicose e etalonamina (Figura 20).

Figura 18 - Análise de componentes principais PC1 x PC3 de plantas MT infectadas ou não por *M. perniciosa* nos tempos 4, 10, 20 e 30 DAI com explicação de variância de 86,27%. Marrom, 5 DAI não infectadas; azul claro, 4 DAI infectadas; preto, 10 DAI não infectadas; azul, 10 DAI infectadas; verde, 20 DAI não infectadas; vermelho, 20 DAI infectadas; laranja 30 DAI não infectadas; roxo 30 DAI infectadas



Já as componentes PC2 x PC4 permitiram a separação das plantas infectadas nos tempos 20 e 30 DAI (PC2 negativa PC4 positiva) de seus respectivos controles e dos tempos 5 DAI e 10 DAI (Figura 21). No gráfico de pesos para as componentes PC2 X PC4, maiores concentrações dos aminoácidos aspartato, glicina e glutamato e do nucleosídeo adenosina, representaram plantas MT infectadas aos 20 e 30 DAI (Figura 22). Além disso, um número relevante sinais referentes a deslocamentos químicos não identificados foram correlacionados as amostras infectadas, os quais estão compreendidos na região correspondente aos carboidratos e ácidos orgânicos (3,0-5,5 ppm) (Figura 22). Isso indica uma alteração no metabolismo de carboidratos durante a infecção (Abdel-Farid et al., 2009; López-Gresa et al., 2010). No entanto, a identificação de açúcares e derivados de açúcares na região entre 3,0-5,5 ppm é desafiadora, devido as conformações similares, ao grande número de isômeros e à sobreposição de sinais desses compostos no espectro de RMN. Em contrapartida, plantas não infectadas em 10, 20 e 30 DAI foram correlacionadas à sacarose e aos ácidos clorogênico+ferúlico (Figura 22).

Figura 21 - Análise de componentes principais PC2 X PC4 de plantas MT infectadas ou não por *M. perniciosa* nos tempos 4, 10, 20 e 30 DAI. Componente PC4 positiva PC2 negativa separou grupos de plantas MT infectadas em 20 e 30 DAI. Marrom, 4 DAI não infectada; azul claro, 4 DAI infectada; preto, 10 DAI não infectadas; azul, 10 DAI infectadas; verde, 20 DAI não infectadas; vermelho, 20 DAI infectadas; laranja 30 DAI não infectadas; roxo 30 DAI infectadas

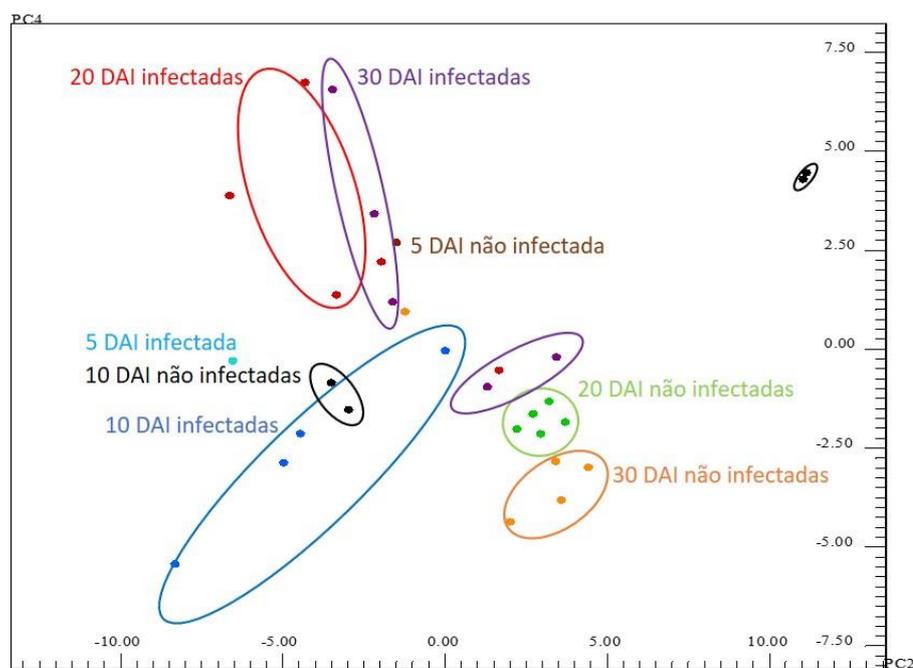


Figura 23 - Integrais relativas de sinais livres nos espectros de ^1H -RMN de plantas infectadas aos 10 DAI, significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com plantas não infectadas ($n=4$)

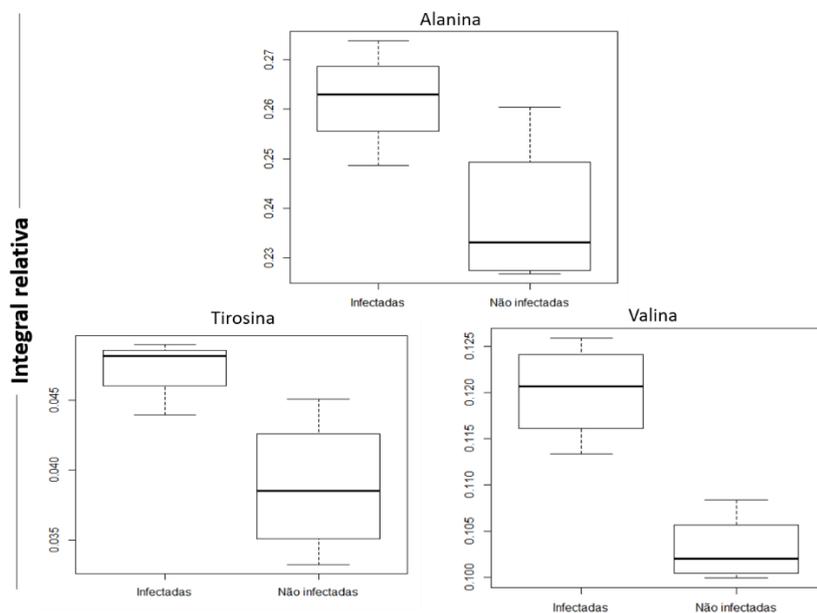


Figura 24 - Integrais relativas de sinais livres nos espectros de ^1H -RMN de plantas infectadas aos 20 DAI, significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com plantas não infectadas ($n=5$)

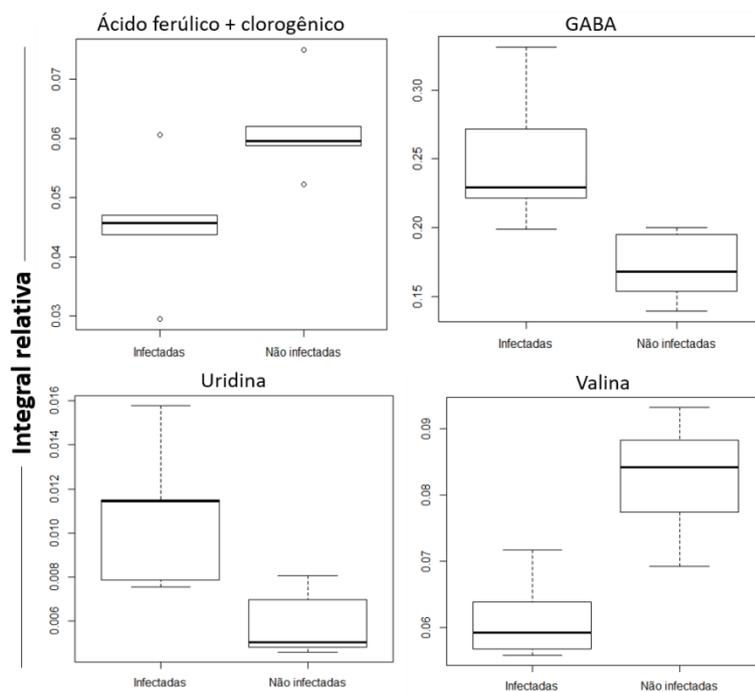
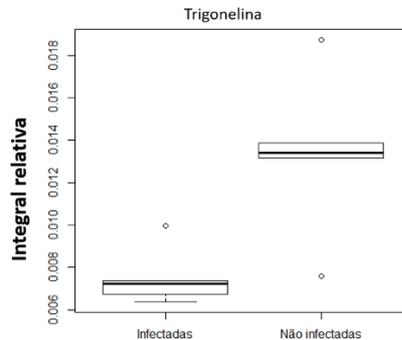


Figura 25 - Integral relativa de sinal livre nos espectros de ^1H -RMN de plantas infectadas aos 30 DAI, significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com plantas não infectadas ($n=5$)



De maneira geral, foi possível observar a indução dos aminoácidos aspartato, glicina e glutamato em plantas MT infectadas com *M. perniciosa* e à baixa produção ou consumo/degradação de derivados do ácido cinâmico, relacionados à via de fenilpropanoides. A participação desses compostos na resposta à infecção por *M. perniciosa* será discutida mais adiante. Embora não detectados níveis alterados de sacarose por GC-MS-TOF, análises quimiométricas de ^1H -RMN revelaram uma correlação desse composto a plantas não infectadas, sugerindo uma redução da sacarose em plantas infectadas. Isso corrobora o consumo energético excessivo, descrito anteriormente, bem como a possível alteração na dinâmica fonte/dreno devido à infecção.

4.5 Análise do RNA-seq relacionada à alteração do metabolismo plantas MT decorrente da infecção por *M. perniciosa*

Visando complementar a investigação das alterações metabólicas decorrentes da infecção de *M. perniciosa* em MT, foi feita uma busca nos dados de sequenciamento em larga escala (RNA-seq) realizado por uma integrante de nosso grupo de pesquisa (Costa, 2017), para avaliar a expressão de genes associados ao metabolismo primário de caules de plantas MT infectadas e não infectadas nos tempos 5, 10, 20 e 30 DAI (Figuras 26, 27 e 28). No total, 120 bibliotecas foram sequenciadas, e os *reads* foram mapeados em 34.879 transcritos do genoma de referência de *S. lycopersicum* ITAG 3.1 (The Tomato Genome Consortium, 2012), incluindo éxons, íntrons, regiões intergênicas e sequências multi-mapping. Os *reads* mapeados em éxons foram utilizados para análise de expressão diferencial (DE), utilizando um modelo linear generalizado (glm, *generalized linear model*) e desenho experimental *one-way*,

com o objetivo de comparar a resposta à infecção com plantas controle em cada tempo avaliado (Costa, 2017).

Caules de plantas MT infectadas exibiram uma reprogramação metabólica, que se tornou mais evidente conforme o desenvolvimento dos sintomas. No início da infecção, aos 5 DAI, foi observada a repressão de genes que codificam para intermediários da via das pentoses-fosfato, e dos genes *NEUTRAL INVERTASE* (Figura 26) e *BRANCHED-CHAIN AMINO ACID TRANSAMINASE 2* (Figura 28), cujos produtos estão envolvidos na síntese de aminoácidos de cadeia ramificada. Em contrapartida, o gene *TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE*, que codifica uma enzima que funciona como um sensor e sinalizador de açúcares em plantas (Wingler et al., 2012), foi induzido (Figura 26).

Aos 10 DAI, genes associados ao aparato fotossintético e ao Ciclo de Calvin e genes envolvidos na síntese e degradação de amido, como *GRANULE-BOUND STARCH SYNTHASE 1* e *BETA-AMYLASE* foram reprimidos (Figuras 26 e 27). No entanto, o gene *TRANSMEMBRANE AMINO ACID TRANSPORTER FAMILY PROTEIN*, responsável pela captação de aminoácidos e peptídeos extracelulares, foi altamente induzido nesse estágio da infecção (Figura 28).

Aos 20 DAI, a reprogramação metabólica decorrente da infecção foi mais intensa. Genes associados à fotorrespiração e Ciclo de Calvin, síntese e degradação de amido e de uma invertase de parede celular putativa foram reprimidos (Figuras 26 e 27). Foi também observada a repressão de um transportador de prolina, *PROLINE TRANSPORTER 2*, que corrobora os níveis reduzidos de prolina detectados por GC-MS-TOF (Figura 16). Além disso, foi observada a indução do gene *INVERTASE 6* (Figura 26), o qual codifica para uma invertase de parede celular associada à formação de drenos em plantas (Berger et al., 2007). Invertases de parede celular catalisam a hidrólise de sacarose em glicose e frutose, liberando essas hexoses para no apoplasto (Tauzin & Giardina, 2014). Também houve um acúmulo dos transcritos *TREHALOSE-PHOSPHATE SYNTHASE 1 (TPS)*, *TREHALOSE 6-PHOSPHATE PHOSPHATASE (TPP)* e *PHOSPHOTRANSFERASE*, ortólogo do gene *HEXOKINASE-LIKE 1* de arábido, o qual, assim como *TPS* e *TPP*, funciona como um sensor de açúcares na planta (Moore et al., 2003) (Figura 26). Além disso, foram induzidos transportadores de açúcares como *POLYOL MONOSACCHARIDE TRANSPORTER 5*, *SUGAR TRANSPORTER PROTEIN 1* e *SUGAR TRANSPORTER PROTEIN 12*, transportadores de aminoácidos e genes envolvidos na biossíntese de glutamato e catabolismo de prolina e fenilalanina (Figuras 26 e 27).

Com relação ao metabolismo secundário das plantas, aos 20 DAI foi possível observar a indução de genes relacionados à via de fenilpropanoides, sobretudo para a formação de lignina (Figura 29). Foi observado o acúmulo de transcritos do gene *PHENYLALANINE AMMONIA LYASE (PAL)*, que codifica para uma enzima chave na via de fenilpropanoides, responsável pela conversão de fenilalanina a ácido cinâmico (Tauzin & Giardina, 2014). Genes da via de biossíntese de lignina, como *HYDROXYCINAMOYLTRANSFERASE* e *CINNAMOYL ALCOHOL DEHYDROGENASE 9* foram induzidos aos 20 DAI. Por sua vez, o gene *CHALCONE SYNTHASE*, que leva à formação de flavonoides, foi reprimido aos 20 DAI. Além disso, foi observada a indução de genes envolvidos na biossíntese de monoterpenos (Figura 29).

O tempo de análise mais avançado, 30 DAI, revelou a repressão de genes relacionados à via das pentoses-fosfato, glicólise e Ciclo de Calvin e aos fotossistemas I e II (Figuras 26 e 27). Os genes de degradação de sacarose, *NEUTRAL INVERTASE* e *CELL WALL INVERTASE* putativa foram reprimidos, assim como transportadores *SWEET*, ortólogos de *SEWEEET 1 E 11* de *arabidopsis*, e *SUGAR TRANSPORTER 1* e *TREHALOSE 6-PHOSPHATE PHOSPHATASE* e genes associados à síntese e degradação de amido (Figura 26). Em contrapartida, *POLYOL MONOSACCHARIDE TRANSPORTER 5* foi bastante induzido, além da indução de *TONOPLAST MONOSACCHARIDE TRANSPORTER 1* e *TREHALOSE-PHOSPHATE SYNTHASE 1* (Figura 26). Além disso, foi identificada a indução de um asparaginase, que catalisa a hidrólise do grupo amida da asparagina, liberando aspartato e amônia. Genes associados ao metabolismo de tirosina também foram induzidos (Figuras 28 e 30).

Figura 26 - *Heatmap* de genes diferencialmente expressos de MT infectadas com *M. pernicioso* em relação a MT não infectadas ($n=5$) associados ao **metabolismo de carboidratos** aos 5, 10, 20 e 30 DAI. Barra de escala representa valores em \log_2 *Fold change*. Branco representa genes não diferencialmente expressos

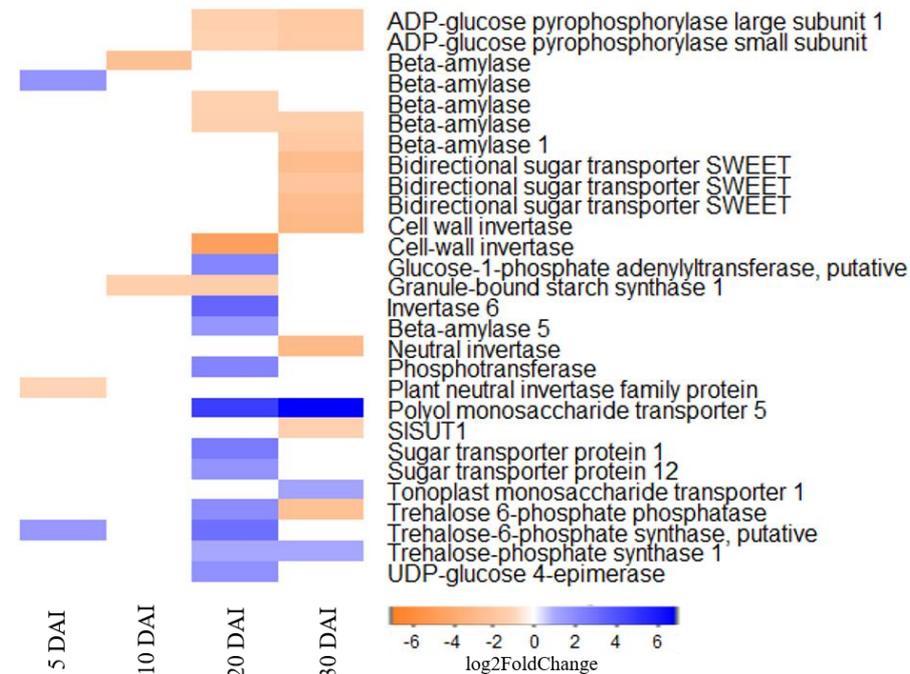


Figura 27 - *Heatmap* de genes diferencialmente expressos de MT infectadas com *M. pernicioso* em relação a MT não infectadas ($n=5$) associados à **fotossíntese** aos 5, 10, 20 e 30 DAI. Barra de escala representa valores em \log_2 *Fold change*. Branco representa genes não diferencialmente expressos.

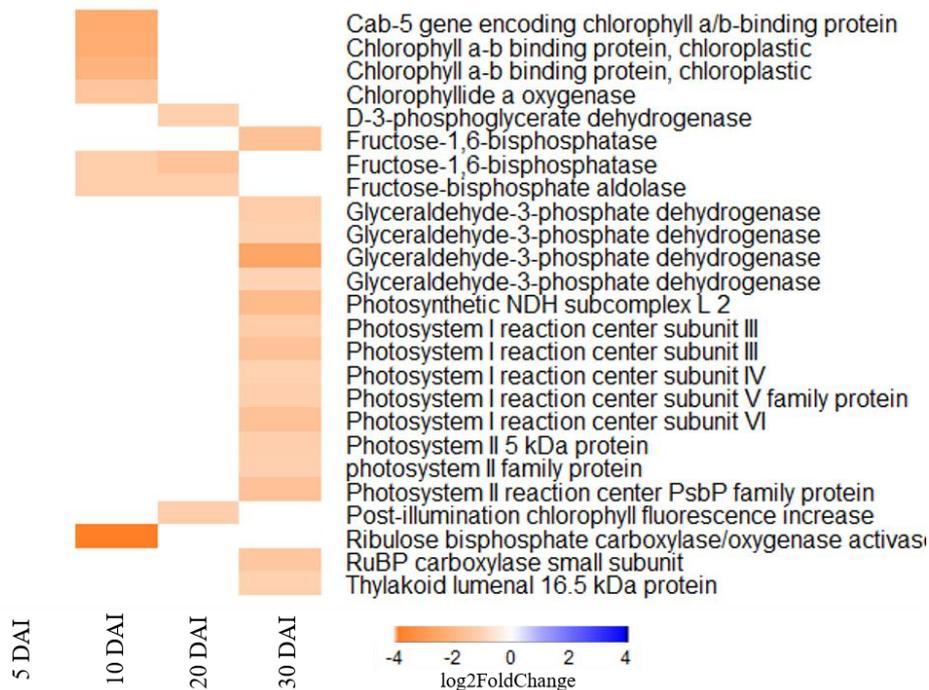


Figura 28 - *Heatmap* de genes diferencialmente expressos de MT infectadas com *M. pernicioso* em relação a MT não infectadas ($n=5$) associados ao **metabolismo de nitrogênio** aos 5, 10, 20 e 30 DAI. Barra de escala representa valores em \log_2 *Fold change*. Branco representa genes não diferencialmente expressos

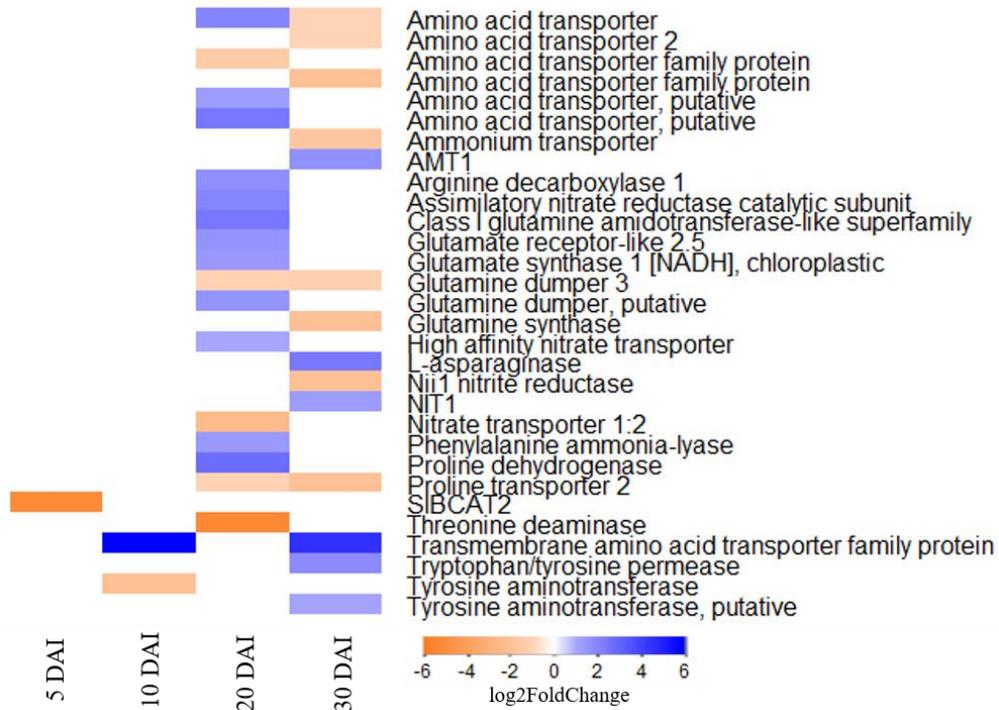


Figura 29 - Representação do *MapMan* (Thimm et al., 2004) de vias metabólicas da infecção por *M. pernicioso* em MT aos 20 DAI. Cada quadrado representa um gene individual. Vermelho indica genes reprimidos e azul induzidos. Barra de escala representa valores de \log_2 *fold change*

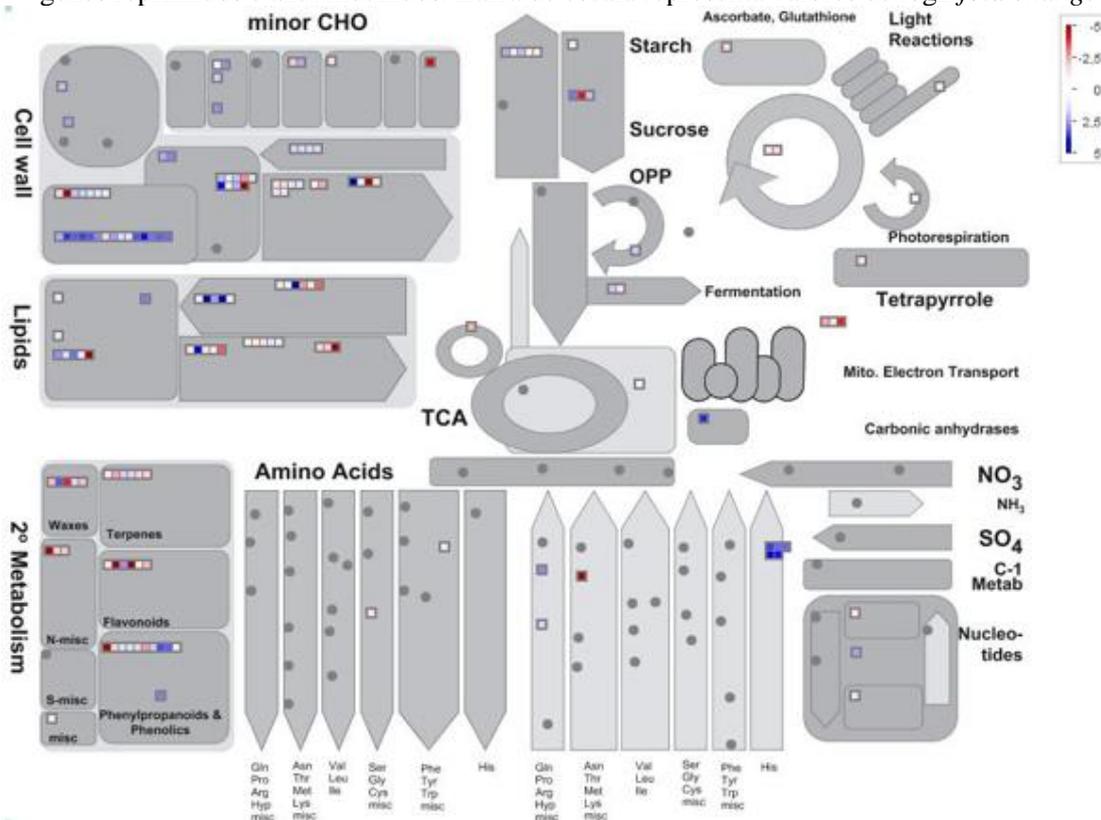
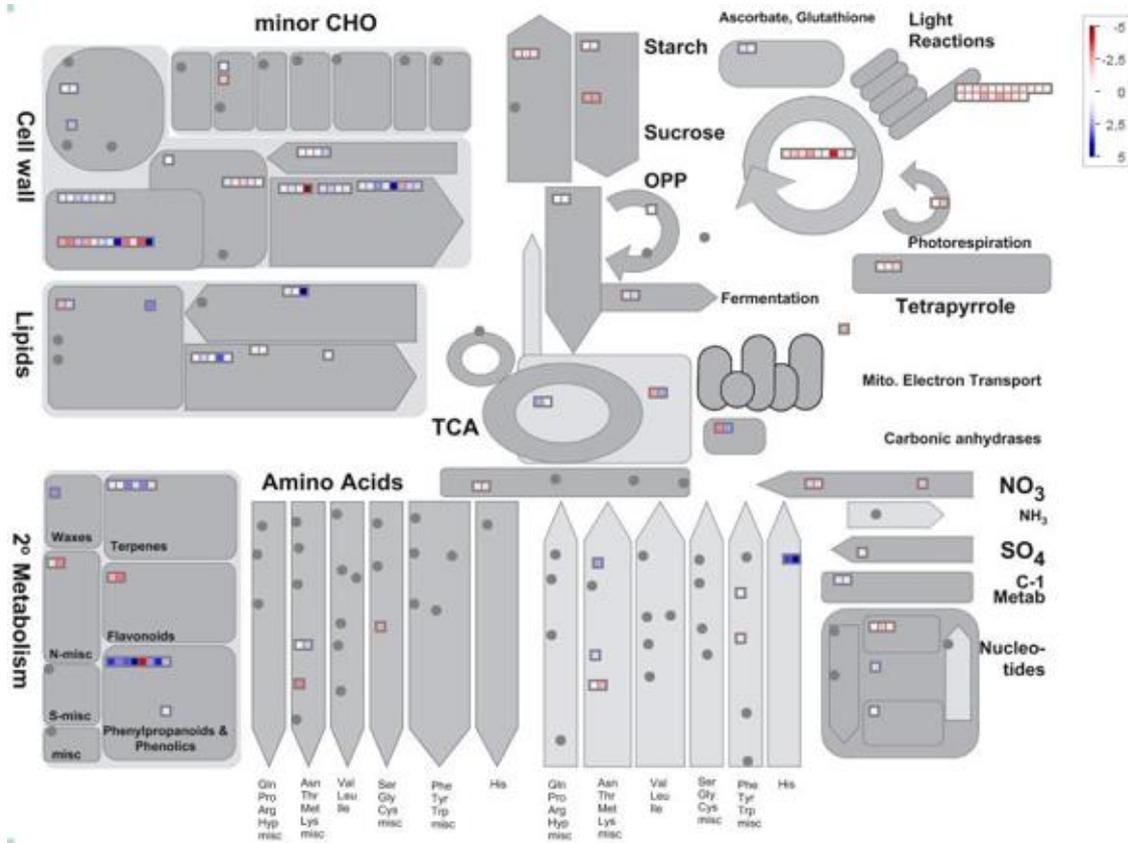


Figura 30 - Representação do *MapMan* (Thimm et al., 2004) de vias metabólicas da infecção por *M. perniciosa* em MT aos 30 DAI. Cada quadrado representa um gene individual. Vermelho indica genes reprimidos e azul induzidos. Barra de escala representa valores de $\log_2 \text{fold change}$



4.6 Translocação de ¹⁴C glicose em plantas MT infectadas por *M. perniciosa*

Com o objetivo de confirmar se os sintomas causados pela infecção por *M. perniciosa* em MT induzem a formação de dreno na região de sintomas (caule), ¹⁴C glicose foi aplicada à folha mais velha (expandida) verdadeira de plantas MT infectadas e não infectadas nos tempos 4, 10 e 20 DAI. A radioatividade específica ($dpm \text{ mg}^{-1}$) foi obtida através da quantificação de ¹⁴CO₂ gerado pela oxidação das plantas, por espectrometria de cintilografia líquida.

O ensaio de translocação de glicose foi otimizado anteriormente, por uma integrante do grupo de pesquisa, com o objetivo de estabelecer o tempo mínimo de exposição da folha à ¹⁴C glicose (J. L. Costa, comunicação pessoal, 10 de janeiro de 2018). No presente trabalho, o primeiro experimento de translocação de ¹⁴C glicose foi realizado em plantas MT não infectadas e infectadas por *M. perniciosa*, com seis replicatas biológicas nos tempos 4, 10 e 20 DAI (dados não mostrados). No segundo experimento, plantas MT não infectadas e infectadas e linha transgênica 35S::*AtCKX2* não infectadas e infectadas com *M. perniciosa* foram avaliadas aos 4 e 10 DAI (dados não mostrados) e aos 20 DAI (Figura 31). O terceiro experimento avaliou

plantas MT tratadas com BA e plantas MT controle aos 5 e 10 dias após a aplicação (DAA) (dados não mostrados) e 20 DAA (Figura 33).

Aos 20 DAI, houve maior translocação de ^{14}C glicose para caules de plantas MT infectadas ($1,84 \text{ dpm mg}^{-1}$) em relação as não infectadas ($1,35 \text{ dpm mg}^{-1}$), demonstrando a formação de dreno na região de sintomas (Figura 31A). Não foi observado aumento de translocação de ^{14}C glicose para folhas, pecíolos, flores ou raízes em plantas MT infectadas em relação as não infectadas aos 20 DAI (Figura 31A). Em relação à massa seca das plantas avaliadas, plantas MT infectadas apresentaram médias significativamente menores de massa seca de folhas, caule, raiz, pecíolos e flores em relação a plantas não infectadas aos 20 DAI (Figura 32A). Curiosamente, aos 4 DAI, quando ainda não é possível observar sintomas visíveis da infecção na parte aérea (engrossamento do caule), plantas MT infectadas apresentaram redução significativa na biomassa de raiz em relação as plantas MT não infectadas (dados não mostrados).

Considerando-se o papel conhecido da citocinina na dinâmica fonte/dreno em plantas (Dhandapani et al., 2017), linhas transgênicas 35S::*AtCKX2* no *background* genético de MT, que superexpressam uma citocinina oxidase (Pino et al., 2010), reduzindo os níveis de citocinina (Eckardt et al., 2003; J. L. Costa, comunicação pessoal, 10 de janeiro de 2018), foram infectadas com *M. perniciosa* e avaliadas para translocação de ^{14}C glicose. Em contraste com os resultados em MT, plantas 35S::*AtCKX2* infectadas não apresentaram aumento na translocação da ^{14}C -glicose para o caule, ou qualquer outro órgão aos 20 DAI (Figura 31B). Além disso, aos 20 DAI, plantas 35S::*AtCKX2* infectadas não apresentaram redução na massa seca em nenhum dos órgãos (Figura 32B). Plantas 35S::*AtCKX2* infectadas por *M. perniciosa* apresentaram menor incidência de infecção, com redução nos sintomas em relação a plantas MT infectadas (Costa, 2017). Portanto, a citocinina parece ser o hormônio (ou um dos) responsável pela formação de dreno na região de sintomas pela infecção por *M. perniciosa*.

Figura 31 - Translocação específica de ^{14}C glicose em plantas A) MT infectadas com *M. pernicioso* ou não infectadas e B) linhas transgênicas 35S::AtCKX2 infectadas com *M. pernicioso* ou não infectadas em 20 DAI. Barras representam médias \pm erro padrão ($n=5$). Médias dos tratamentos seguidas por asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste t ($p \leq 0.05$), comparando plantas infectadas de não infectadas

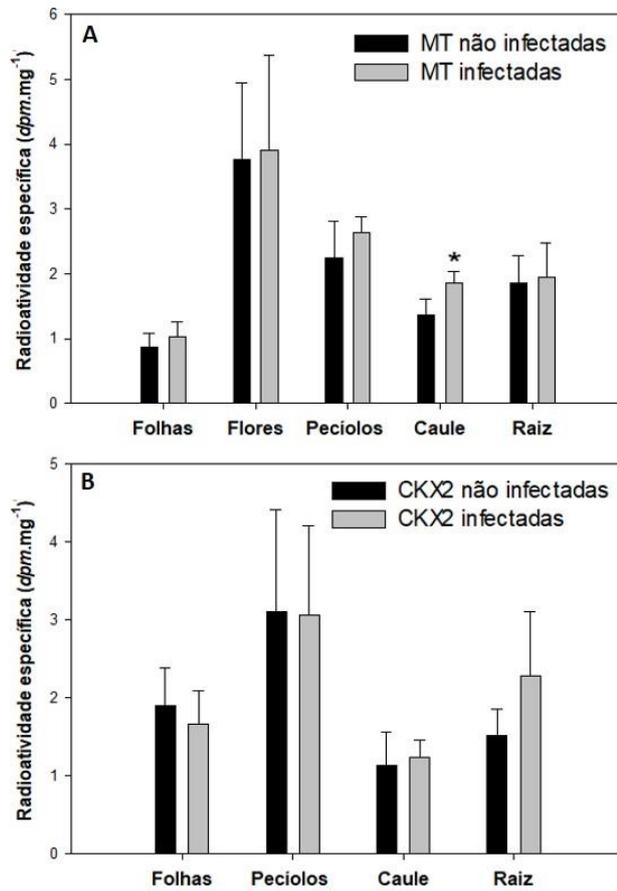
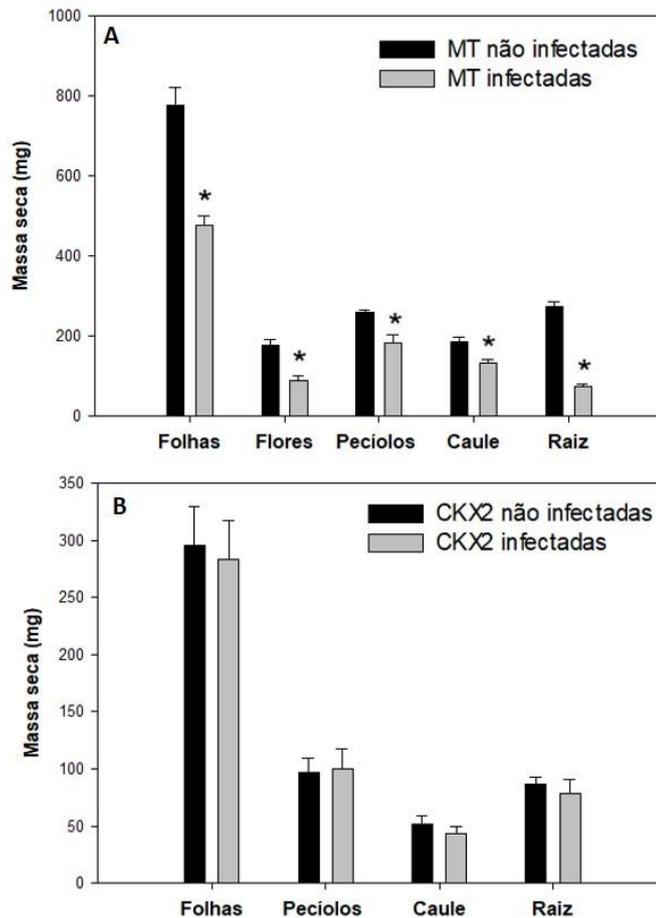


Figura 32 - Massa seca de plantas A) MT infectadas com *M. pernicioso* ou não infectadas e B) linhas transgênicas 35S::*AtCKX2* infectadas com *M. pernicioso* ou não infectadas em 20 DAI. Barras representam médias \pm erro padrão ($n=6$). Médias dos tratamentos seguidas por asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste t ($p \leq 0.05$), comparando plantas infectadas e não infectadas



Para testar o papel da citocinina na indução de dreno de açúcares, foi aplicada nos meristemas apicais e axilares de plantas MT a citocinina sintética benziladenina (20 mM - BA) nos tempos 2 e 10 DAI. O teste com doses crescentes de BA foi realizado previamente por Costa (2017), como doses baseadas em outro trabalho (Roman et al., 2016). Plantas tratadas com BA apresentaram engrossamento do caule e perda de dominância apical, semelhantemente as plantas infectadas com *M. pernicioso*, com média de diâmetro do caule maior que plantas MT controle. Plantas MT que receberam BA foram avaliadas para radioatividade específica ($dpm\ mg^{-1}$) de ^{14}C glicose aos 5 e 10 dias (dados não mostrados) e 20 dias após a aplicação de BA (DAA). Aos 20 DAA, plantas MT que receberam BA apresentaram aumento na translocação de ^{14}C -glicose para folhas, caule e raiz em relação às plantas MT não tratadas (Figura 33). Com respeito à massa seca aos 20 DAA,

foi observada uma diminuição significativa na massa seca de folhas e raízes de plantas MT tratadas com BA em relação as não tratadas (Figura 34).

Figura 33 - Translocação específica de ^{14}C glicose em plantas MT que receberam 20 mM benziladenina (BA) ou não aos 20 DAA. Barras representam médias \pm erro padrão ($n=6$). Médias dos tratamentos seguidas por asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste t ($p \leq 0.05$), comparando plantas tratadas com BA e não tratadas

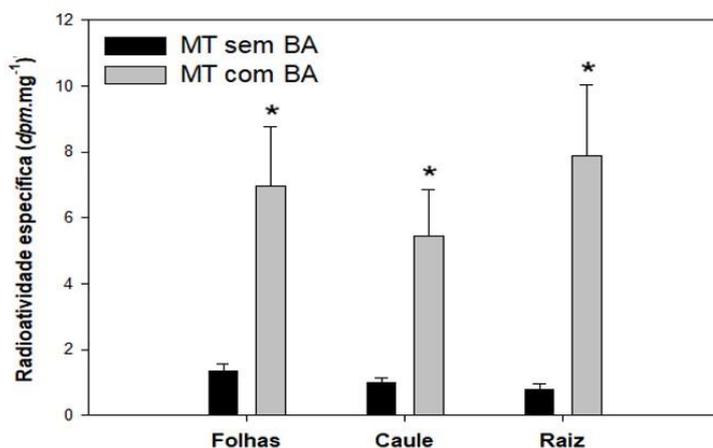
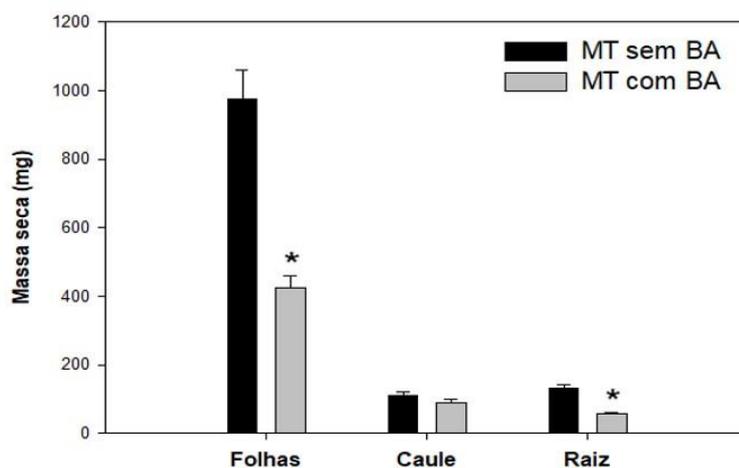


Figura 34 - Massa seca de plantas MT que receberam 20 mM benziladenina (BA) ou não tratadas aos 20 DAA. Barras representam médias \pm erro padrão ($n=6$). Médias dos tratamentos seguidas por asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste t ($p \leq 0.05$), comparando plantas tratadas com BA ou não tratadas



Em resumo, foi observado um aumento na translocação de ^{14}C -glicose para a região sintomática (caule) de plantas MT infectadas por *M. perniciosa*, enquanto que a infecção de linhas transgênicas 35S::*AtCKX2* não resultou no aumento da translocação. A aplicação de BA em plantas MT induziu o aumento da translocação de ^{14}C glicose para o caule, folhas e raízes. Isso indica um papel da citocinina na remobilização de ^{14}C glicose em MT, presumidamente à formação de dreno de nutrientes.

4.7 Aplicação de sacarose em plantas MT infectadas por *M. pernicioso*

Sabe-se que a sacarose possui um papel importante na transição da dinâmica fonte/dreno e na sinalização para a expressão de genes relacionados à resposta de defesa contra patógenos em plantas (Morkunas & Ratajczak, 2014). Os dados de metabolômica, transcritômica e de translocação de ^{14}C -glicose em plantas MT infectadas por *M. pernicioso* sugerem a formação de dreno típico de nutrientes na região de sintomas. Para investigar o papel dos açúcares na formação de sintomas e/ou na resposta de defesa de MT contra *M. pernicioso*, 50 μL de 1 M sacarose foi aplicado todos os dias, nos meristemas apical (ápice caulinar) e axilares de plantas MT, com início aos 2 DAI e finalização aos 34 DAI. Previamente, havia sido realizado um experimento com a aplicação de sacarose nas concentrações 0,5 M e 1 M (Kretschmer et al., 2017) nos meristemas apical e axilares de plantas MT infectadas por *M. pernicioso* ou não infectadas, e a aplicação de sacarose nas mesmas concentrações via “spray” nas folhas, incluindo três repetições com cinco plantas por repetição (dados não mostrados) para otimizar a metodologia utilizada. O modo de aplicação de 1 M sacarose diretamente nos meristemas se mostrou a metodologia mais eficiente (Figura 35).

Os sintomas da infecção por *M. pernicioso*, como altura (cm) e diâmetro de caule (mm), de plantas MT infectadas, ou não, por *M. pernicioso* e plantas MT infectadas, ou não, tratadas com 1 M sacarose ou solução *mock* foram avaliados aos 5, 15, 25 e 35 DAI (Figuras 36 e 37). Aos 35 DAI, foi possível observar uma redução significativa no diâmetro médio de plantas MT infectadas por *M. pernicioso* tratadas com sacarose em relação às plantas MT infectadas tratadas com solução *mock* (Figura 37B). Ao contrário do que era esperada, a aplicação de sacarose reduziu os sintomas da infecção por *M. pernicioso* em MT.

Figura 35 - Representação de plantas MT não infectadas (painel superior) sem aplicação de 1 M sacarose ou infectadas por *M. perniciosa* (painel inferior) (A, B, E e F) e plantas MT infectadas (painel superior) sem aplicação de sacarose ou infectadas por *M. perniciosa* (painel inferior) tratadas com 1 M sacarose (C, D, G e H) aos 35 DAI

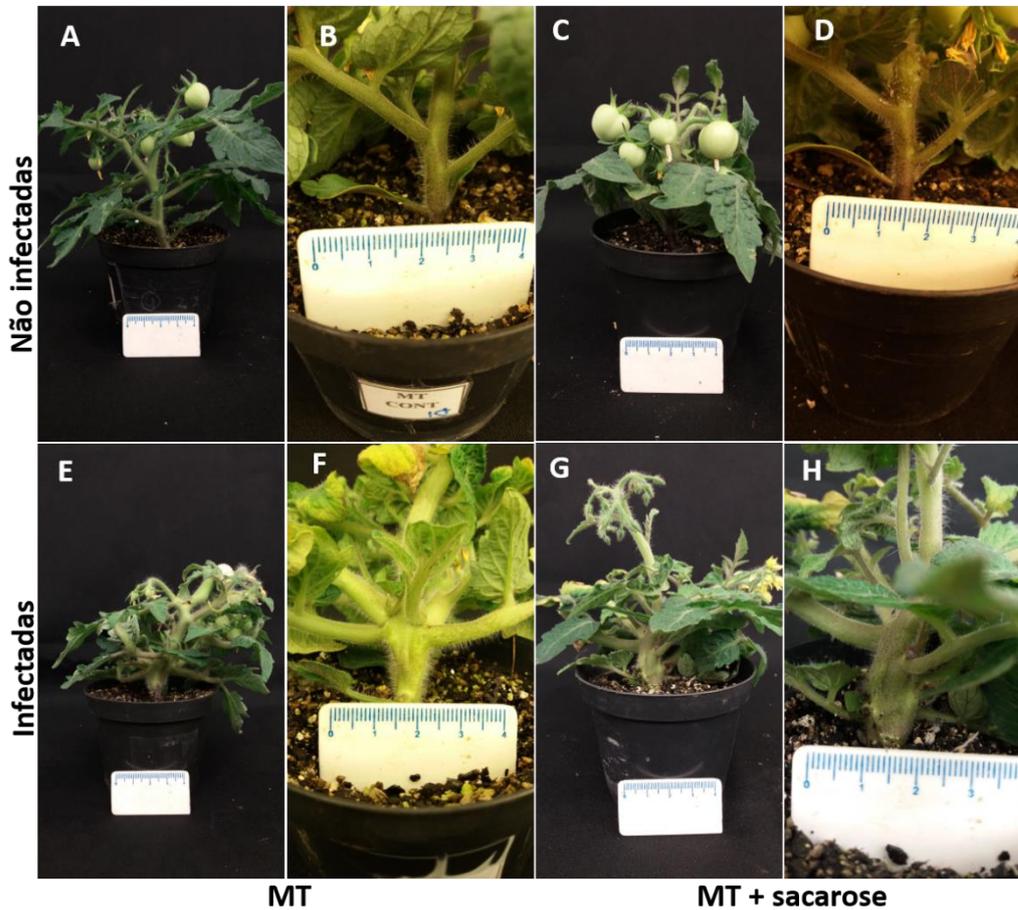


Figura 36 - Altura (cm) de plantas MT não infectadas e infectadas com *M. perniciosa*, e plantas MT não infectadas e infectadas tratadas com 1 M sacarose aos A) 5, 15, 25 e 35 DAI e B) 35 DAI. Barras representam médias \pm erro padrão de 3 parcelas com 5 plantas por parcela ($n=15$)

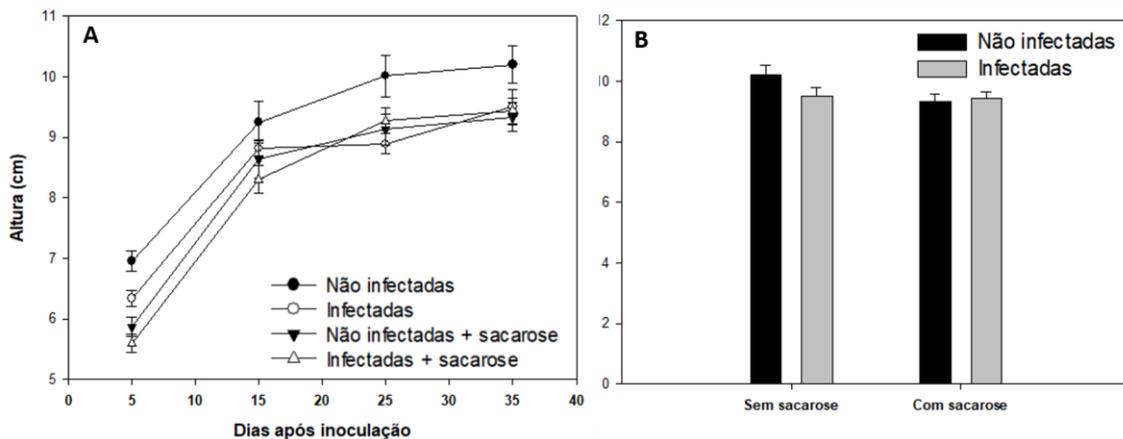
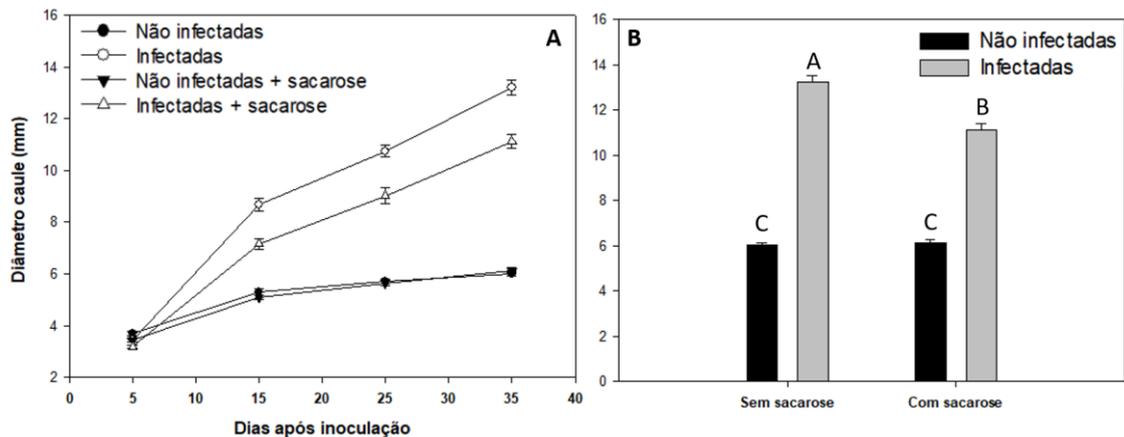


Figura 37 - Diâmetro (mm) do caule de plantas MT infectadas ou não por *M. perniciosa* e plantas MT tratadas ou não com 1 M sacarose aos A) 5, 15, 25 e 35 DAI e B) 35 DAI. Barras representam médias \pm erro padrão de 3 parcelas com 5 plantas por parcela ($n=15$). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Círculo aberto apresenta plantas MT não infectadas, círculo preenchido representa plantas infectadas por *M. perniciosa*, triângulo aberto representa plantas MT infectadas por *M. perniciosa* tratadas com sacarose e triângulo preenchido representa plantas não infectadas tratadas com sacarose

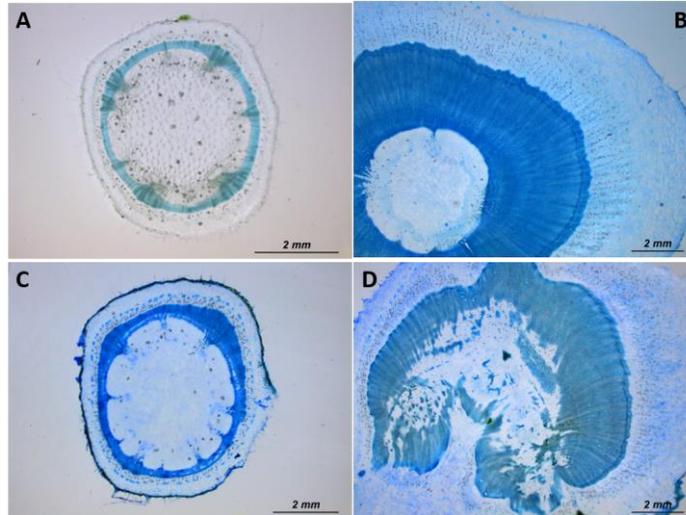


O aumento no diâmetro do caule de plantas MT infectadas por *M. perniciosa* está relacionado com o aumento no xilema, floema e córtex (Marelli et al., 2009; Deganello et al., 2014; Costa, 2017). Para avaliar o padrão celular e quais tecidos dos caules de plantas MT infectados por *M. perniciosa* aplicadas com sacarose estão associados à redução do diâmetro do caule, foram realizadas análises histológicas de cortes transversais do caule de plantas MT não infectadas e infectadas aplicadas ou não com sacarose, utilizando três replicatas biológicas.

Cortes transversais de caules de plantas MT não infectadas tratadas com sacarose apresentaram conformação semelhante às plantas MT não infectadas controle (Figura 38A e C). No entanto, como reportado anteriormente, caules de plantas MT infectadas por *M. perniciosa* apresentaram aumento no xilema, floema e córtex (Figura 38B). Por sua vez, a aplicação de sacarose induziu um padrão irregular na formação dos tecidos dos caules de plantas infectadas, com redução no xilema, floema e córtex em relação às plantas infectadas tratadas com solução *mock* (Figura 38D).

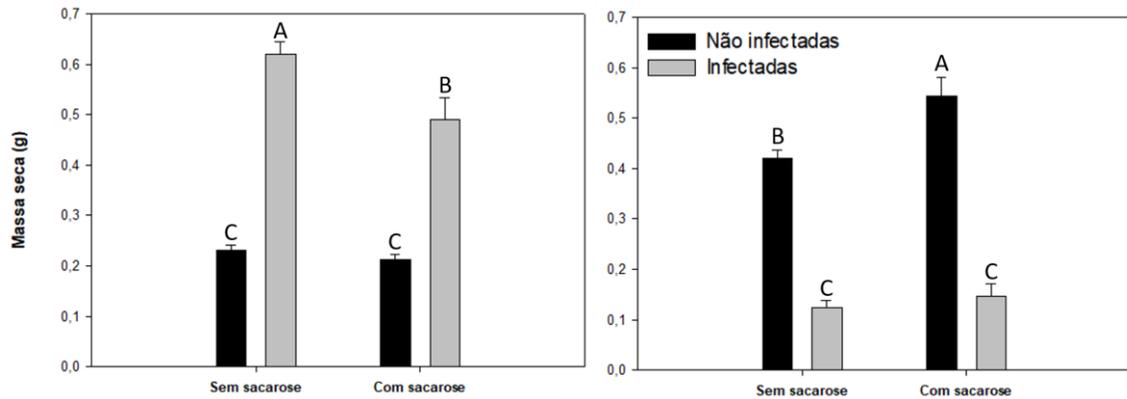
A formação do tecido vascular de plantas é promovida pela ação dos hormônios auxina e citocinina (Aloni et al., 1995). O estudo da regulação hormonal de plantas MT após a inoculação com *M. perniciosa* demonstrou que a infecção por esse fungo promove a indução dos hormônios citocinina e auxina, levando à diferenciação e proliferação de células do tecido vascular e, conseqüentemente, promovendo o engrossamento do caule (Costa, 2017).

Figura 38 - Seção transversal do caule de plantas de plantas MT infectadas ou não por *M. pernicioso* e plantas MT tratadas ou não com 1 M sacarose. A) MT não infectado, B) MT infectado, C) MT não infectado aplicado com sacarose e D) MT infectado aplicado com sacarose



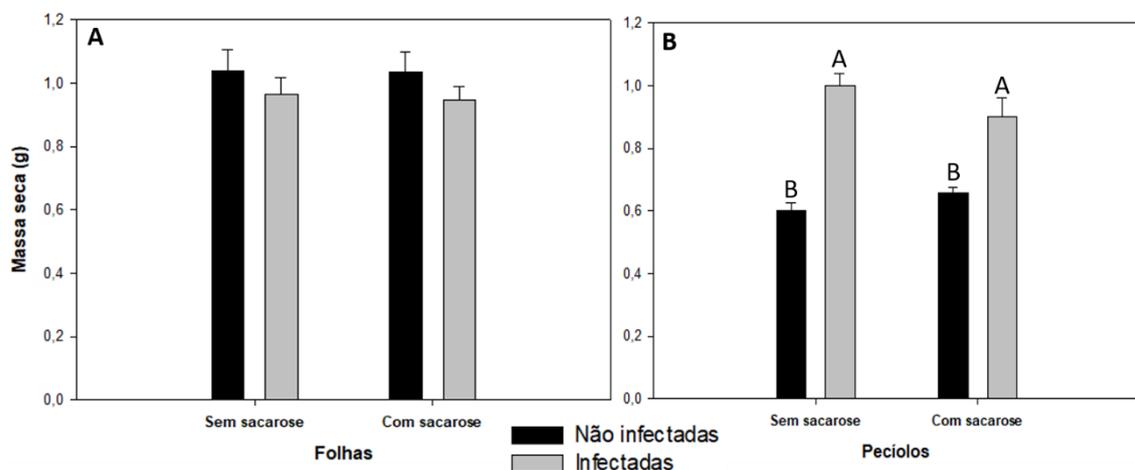
Para verificar outros sintomas característicos da infecção por *M. pernicioso*, foi realizada a avaliação da altura e massa seca dos caules, raízes, pecíolos, folhas, flores e frutos de plantas infectadas ou não, e tratadas com 1 M sacarose ou com solução *mock* aos 40 DAI. Assim como observado na avaliação do diâmetro médio de caule, a aplicação de sacarose em plantas MT infectadas reduziu a biomassa da região com sintomas no caule (3 cm) em relação à mesma região em caules de plantas infectadas aplicadas com solução *mock* (Figura 39A). Além disso, a aplicação de sacarose em plantas MT infectadas por *M. pernicioso* promoveu a redução na massa seca de raízes em relação a plantas não infectadas com sacarose, similarmente ao que ocorre em plantas infectadas tratadas com a solução *mock* em comparação com as não infectadas (Figura 39B). Portanto, embora a aplicação de sacarose nos meristemas apical e axilares de plantas MT infectadas por *M. pernicioso* tenha resultado na diminuição do engrossamento do caule em relação a plantas infectadas tratadas com solução *mock*, não foi observado um efeito de recuperação da biomassa das raízes pela aplicação da sacarose.

Figura 39 - Avaliação de caules de MT após infecção com *M. perniciosa* e tratamento com sacarose. Massa seca (g) de A) região do caule com sintoma (3 cm) e B) raízes de plantas não infectadas, infectadas por *M. perniciosa*, não infectadas com sacarose e infectadas por *M. perniciosa* com sacarose aos 40 DAI. Barras representam médias \pm erro padrão ($n=10$). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$)



A massa seca de folhas e pecíolos também foi avaliada. Não foi observada diferença significativa para massa seca de folhas, tanto de plantas MT infectadas por *M. perniciosa* ou não infectadas, quanto de plantas infectadas ou não infectadas tratadas com sacarose aos 40 DAI (Figura 40A). Contudo, a infecção por *M. perniciosa* aumentou a massa seca de pecíolos em MT (Figura 40B), devido ao engrossamento reportado anteriormente. A aplicação de sacarose não reduziu a massa seca de pecíolos de plantas infectadas (Figura 40B), como ocorreu no caule com sintoma (Figura 39A).

Figura 40 - Caracterização de folhas e pecíolos de MT após infecção com *M. perniciosa* e tratamento com sacarose. Massa seca (g) de A) folhas e B) pecíolos de plantas não infectadas, infectadas por *M. perniciosa*, não infectadas com sacarose e infectadas por *M. perniciosa* com sacarose aos 40 DAI. Barras representam médias \pm erro padrão ($n=10$). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$)



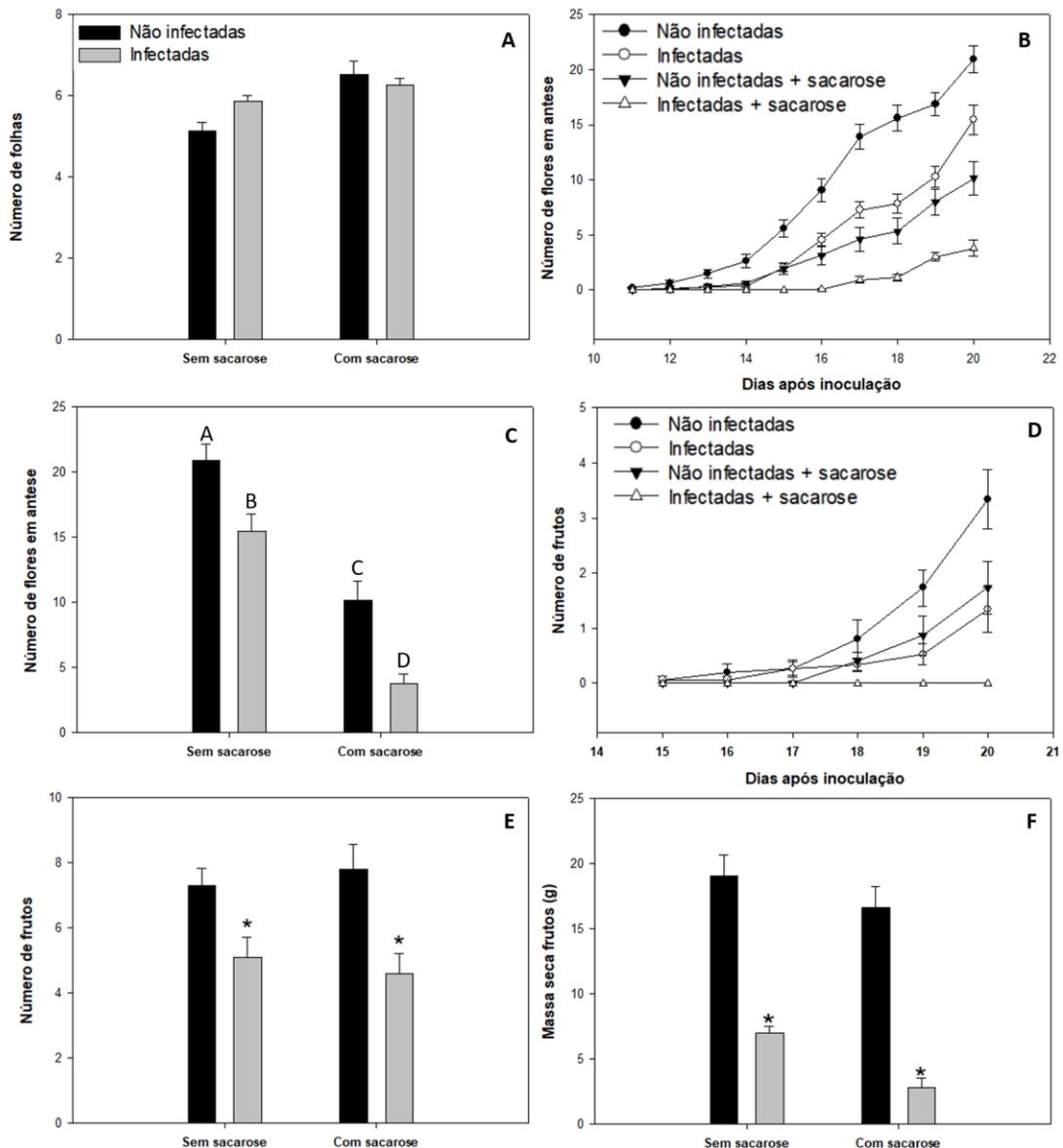
A infecção por patógenos (hemi)biotróficos pode resultar na perda de produtividade de plantas hospedeiras devido à alteração da dinâmica fonte/dreno das plantas e ao alto custo energético nas respostas de defesa (Lemoine et al., 2013). Além disso, como a sacarose pode atuar como sinalizador e agente trófico na transição da fase vegetativa para reprodutiva em plantas (Roitsch et al., 2003), o número e a biomassa de flores e frutos de plantas MT infectadas por *M. pernicioso* e, após o tratamento com sacarose, foram avaliados (Figura 41).

Com o objetivo de verificar se a infecção por *M. pernicioso* atrasa a transição para o florescimento em plantas MT e, considerando-se o papel da sacarose na transição da fase vegetativa para reprodutiva em plantas, foi realizada a contagem de folhas no eixo principal, antes da primeira inflorescência (Samach & Lotan, 2007), em plantas MT infectadas e não infectadas tratadas com sacarose aos 10 DAI. Não foi observada diferença significativa no número de folhas entre plantas infectadas e não infectadas tratadas com sacarose e em plantas infectadas ou não infectadas tratadas solução *mock* (Figura 41A). Visto que as plantas MT foram inoculadas com *M. pernicioso* aos 16 dias após a semeadura, período no qual o meristema já se diferenciou em meristema de inflorescência (Silva, 2016), não foi possível observar um efeito no atraso na transição do meristema vegetativo para reprodutivo.

No entanto, para verificar se a infecção por *M. pernicioso* e/ou o tratamento com sacarose poderiam afetar o desenvolvimento de flores, o número de flores em antese foi contado todos os dias, desde 11 DAI até 20 DAI (Figura 41B). Aos 20 DAI, o número de flores em antese de plantas infectadas por *M. pernicioso* foi menor em relação às plantas não infectadas (Figura 41C). Curiosamente, a aplicação de sacarose também reduziu o número de flores em antese em relação a plantas MT tratadas com solução *mock*, e a aplicação de sacarose em plantas MT infectadas por *M. pernicioso* reduziu ainda mais o desenvolvimento das flores (Figura 41C).

A dinâmica da formação de frutos no tempo também foi verificada durante a infecção por *M. pernicioso*, por meio da contagem de frutos, desde 15 DAI até 20 DAI e aos 40 DAI em plantas MT infectadas e não infectadas, tratadas com sacarose ou solução *mock* (Figura 41D). Aos 40 DAI, quando os frutos atingiram o estágio de amadurecimento, plantas MT infectadas por *M. pernicioso* apresentaram número reduzido de frutos em relação a plantas MT não infectadas (Figura 41E). Da mesma maneira, plantas infectadas tratadas com sacarose apresentaram número reduzido de frutos em relação a não infectadas (Figura 41E). A massa seca total de frutos de plantas MT infectadas por *M. pernicioso* também foi reduzida em relação a plantas MT não infectadas, assim como a massa seca de frutos de plantas infectadas tratadas com sacarose em relação a não infectadas tratadas com sacarose (Figura 41F).

Figura 41 - Avaliação de flores e frutos de MT após infecção com *M. pernicioso* e tratamento com sacarose. A) número de folhas no eixo principal de plantas antes da primeira inflorescência, B) número de flores em antese desde 11 DAI até 20 DAI, C) número de flores em antese aos 20 DAI, D) número de frutos desenvolvidos desde 15 DAI até 20 DAI, E) número de frutos aos 40 DAI e F) massa seca (g) total de frutos de plantas não infectadas, infectadas por *M. pernicioso*, não infectadas com sacarose e infectadas por *M. pernicioso* com sacarose. Barras representam médias \pm erro padrão ($n=10$). Médias dos tratamentos seguidas por asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste t ($p \leq 0.05$) entre plantas infectadas em relação a não infectadas nas mesmas condições. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)



A expressão relativa de genes associados ao metabolismo de açúcar em plantas MT foi avaliada via RT-qPCR em amostras coletadas aos 20 DAI, para tentar esclarecer o papel da sacarose na redução de sintomas de engrossamento de caule em plantas MT infectadas por *M. pernicioso* (Figura 42). Os transcritos dos transportadores de sacarose *SUCROSE*

TRANSPORTER PROTEIN, *SUT1* e *SUT2*, acumularam em amostras de plantas MT infectadas por *M. pernicioso* em relação a plantas MT não infectadas. No entanto, a expressão desses genes foi reduzida em plantas MT tratadas com sacarose em relação a plantas MT com solução *mock*. Em plantas MT infectadas por *M. pernicioso* tratadas com sacarose, houve um aumento na expressão de *SUT1* em relação as plantas MT não infectadas tratadas com sacarose. No entanto, a diferença entre as plantas infectadas e não infectadas tratadas com sacarose foi bem inferior que entre plantas infectadas e não infectadas tratadas com solução *mock* (Figura 42).

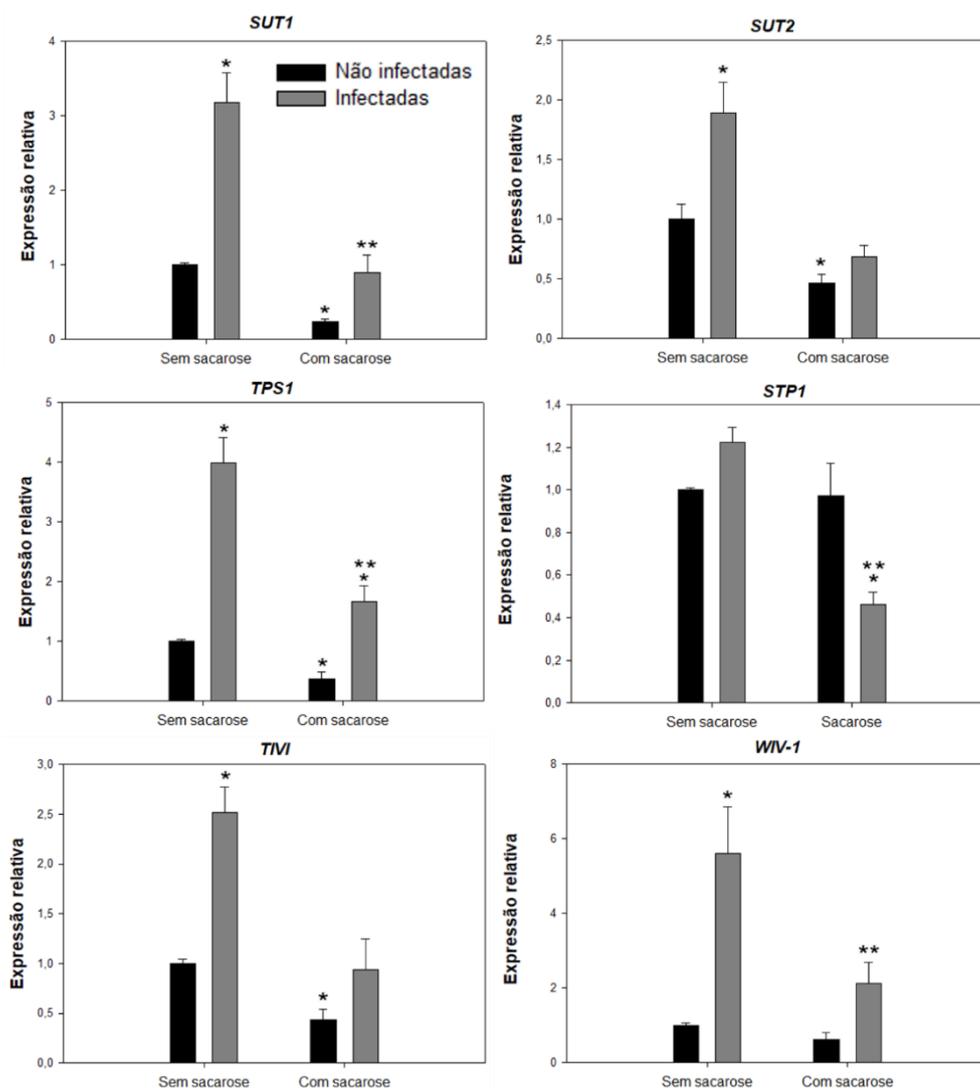
O transcrito do gene *TREHALOSE PHOSPHATE SYNTHASE 1 (TPS1)*, que codifica uma enzima que funciona como um sensor e sinalizador de açúcares em plantas (Wingler et al., 2012), também acumulou em plantas MT infectadas em relação as não infectadas, como mostrado nos dados de RNA-seq (Figura 26). Já nas plantas MT infectadas tratadas com sacarose, a expressão de *TPS1* aumentou em relação as plantas MT não infectadas tratadas com sacarose. No entanto, esse aumento foi bem inferior em relação ao aumento da expressão entre plantas MT infectadas e não infectadas tratadas com solução *mock* (Figura 42).

O transportador de hexoses *SUGAR TRANSPORTER PROTEIN 1 (STP1)*, responsável pela captação de hexoses para dentro da célula (Yamada et al., 2016), foi diferencialmente expresso em plantas MT infectadas por *M. pernicioso* em relação as não infectadas nos dados de RNA-seq. No entanto, não foi possível observar diferença estatística nos dados de RT-qPCR para esse gene entre plantas MT infectadas e não infectadas. Curiosamente, a expressão de *STP1* foi reduzida em plantas infectadas tratadas com sacarose em relação às plantas não infectadas que receberam sacarose e as plantas não infectadas tratadas com solução *mock* (Figura 42). Esse resultado indica que, possivelmente, *STP1* tenha um papel na redução de sintomas de plantas infectadas após aplicação com sacarose.

As invertases são as enzimas chave no metabolismo de açúcar em plantas, atuando na catálise de sacarose em glicose e frutose. As invertases vacuolares participam do armazenamento de açúcares em órgãos dreno e na osmoregulação e expansão celular, enquanto que as invertases de parede celular atuam no particionamento de sacarose no apoplasto, sendo essenciais na formação de dreno em plantas (Wang et al., 2015). A expressão dos genes codificadores de invertases de vacúolo *VACUOLAR INVERTASE (TIVI)* e de parede celular, *CELL WALL INVERTASE 1 (WIV-1)*, também foram avaliadas por expressão relativa em plantas infectadas e não infectadas aplicadas ou não com sacarose. A expressão de *TIVI* aumentou em plantas MT infectadas em relação as não infectadas, mas não foi observado um aumento na expressão em plantas MT infectadas tratadas com sacarose em relação as não infectadas tratadas com sacarose. Por sua vez, a infecção por *M. pernicioso*

aumentou a expressão de *CWI-1* (*INVERTASE 6*), como mostrado nos dados de RNA-seq (Figura 26). Também foi observado o aumento na expressão de *CWI-1* em plantas MT infectadas tratadas com sacarose em relação as não infectadas tratadas com sacarose, mas esse aumento foi menor que em plantas infectadas tratadas com solução *mock* (Figura 42).

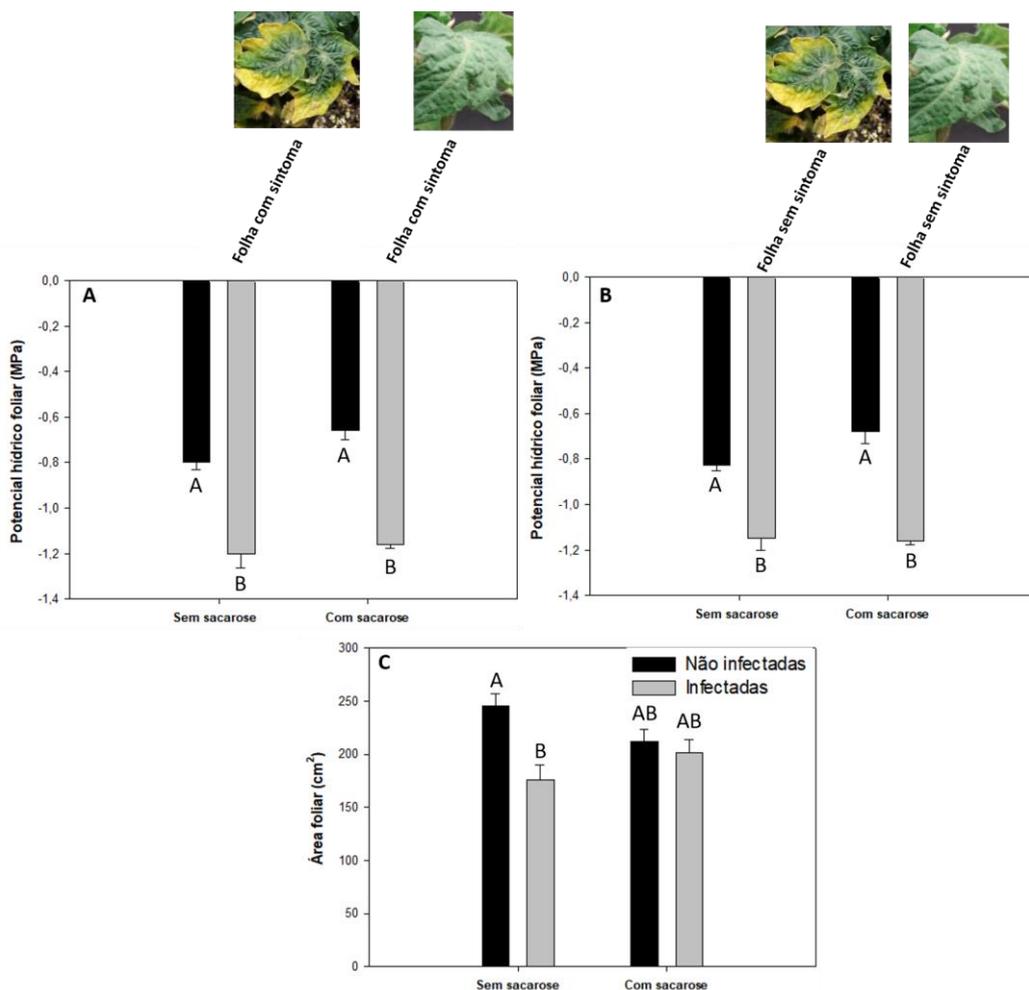
Figura 42 - Expressão relativa de genes associados ao metabolismo de açúcar em plantas MT infectadas ou não por *M. perniciosa* e tratadas ou não com 1 M sacarose. Barras representam médias \pm erro padrão ($n=5$). Médias dos tratamentos seguidas por asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste *t* ($p \leq 0.05$) comparando plantas infectadas de não infectadas. Médias dos tratamentos seguidas por 2 asteriscos (**) são significativamente diferentes pelo teste *t* ($p \leq 0.05$) em comparação com o controle (MT não infectadas sem sacarose)



Aplicação de 1 M sacarose reduziu os sintomas no caule, mas não em outras regiões das plantas MT. Para verificar se a redução de sintomas poderia estar correlacionada a um efeito fisiológico da sacarose exógena, o potencial hídrico de plantas infectadas aplicadas com sacarose foi avaliado (Figura 43). Como a sacarose é um osmólito, esperava-se que a aplicação

desse açúcar pudesse interferir no potencial hídrico das plantas MT infectadas por *M. pernicioso*, diminuindo ainda mais seus valores. No entanto, não foi observada diferença significativa entre plantas MT infectadas tratadas ou não com sacarose nas folhas com sintoma (Figura 43A) e sem sintoma (Figura 43B). Ainda, a aplicação de sacarose em plantas MT infectadas não afetou o desenvolvimento foliar das plantas, como ocorre durante a infecção por *M. pernicioso* em MT tratado com solução *mock* (Figura 43C). A redução nos sintomas de MT infectadas por *M. pernicioso* com aplicação de sacarose não está relacionada à diminuição do potencial hídrico foliar. Possivelmente, a aplicação de sacarose possa alterar o potencial hídrico do caule de plantas infectadas, mas não o potencial hídrico das folhas.

Figura 43 - Status de água do efeito da sacarose na infecção por *M. pernicioso* em MT. A) potencial hídrico Ψ_w (MPa) de folhas com sintoma e B) de folhas sem sintomas de plantas MT infectadas ou não por *M. pernicioso* e tratadas ou não com sacarose aos 35 DAI. C) área foliar (cm^2) total de plantas MT infectadas por *M. pernicioso* e não infectadas e infectadas por *M. pernicioso* e não infectadas tratadas com sacarose aos 35 DAI. Barras representam médias \pm erro padrão ($n=10$). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$)



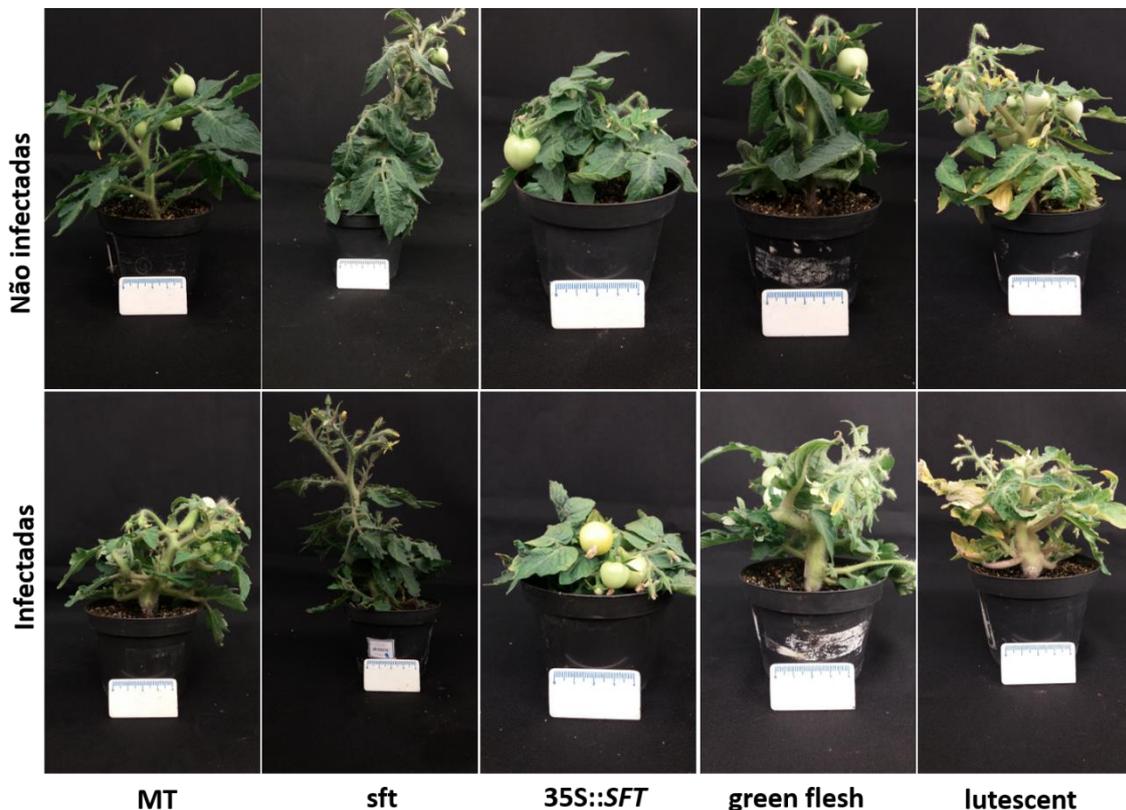
4.8 Mutantes para senescência e florescimento em MT

No patossistema *M. perniciosa* x *T. cacao*, a elucidação dos fatores responsáveis pela transição da fase biotrófica para necrotrófica da infecção por *M. perniciosa* é objetivo de diversos estudos. Um estudo da infecção do cacauzeiro por *M. perniciosa* demonstrou que a presença de açúcares redutores atrasa o processo de transição e necrose (dicarionização do micélio saprotrófico) do tecido (Evans, 1980). Mais recentemente, foi demonstrado que o gasto excessivo de energia em tecidos infectados de cacau (vassouras-verdes) em resposta a *M. perniciosa* resulta na privação de carbono, levando a um processo de senescência que sinaliza para a transição da fase biotrófica para necrotrófica (Teixeira et al., 2014). Dessa forma, a escassez de açúcares solúveis no apoplasto de regiões infectadas de cacauzeiro foi sugerida como o motivo para a transição de *M. perniciosa* (Barau et al., 2014).

Na infecção de MT por *M. perniciosa* o tecido infectado não sofre necrose visível, como observado em cacauzeiro (Deganello et al., 2014; Costa, 2017). Com o objetivo investigar o papel da senescência na infecção de *M. perniciosa* em MT, mutantes *green flesh* e *lutescent* em *background* MT, que apresentam fenótipo de senescência retardada e prematura, respectivamente, foram analisados para a formação de sintomas característicos da infecção. O gene com perda de função em *green flesh*, *STAY GREEN*, codifica para uma proteína necessária para a degradação de clorofila (Akhtar et al., 1999). Por sua vez, o mutante *lutescent* apresenta amarelamento precoce das folhas, devido ao processo prematuro de senescência. Em tomateiro, os mutantes *lutescent 1* e *lutescent 2* apresentam fenótipo com taxas reduzidas de síntese de clorofila durante estiolamento e o aumento na perda de clorofila em folhas e frutos conforme o desenvolvimento das plantas (Barry et al., 2012).

O gasto de energia necessária para a defesa de plantas contra patógenos, geralmente, desvia recursos de vias como crescimento e reprodução (Huot et al., 2014). Além disso, considerando-se o atraso/deficiência na formação de flores em plantas MT infectadas (Figura 41), com o objetivo de investigar se a infecção por *M. perniciosa* poderia atrasar a indução do florescimento em plantas MT, o mutante *single flower truss (sft)* (Lifschitz & Eshed, 2006) e a linha transgênica *35S::SFT* no *background* MT (Silva, 2016), que apresentam fenótipo de atraso e precocidade no florescimento, respectivamente, foram analisados para formação de sintomas e contagem do número de flores (Figura 44).

Figura 44 - Representação de plantas MT, *sft*, *35S::SFT*, *green flesh* e *lutescent* não infectadas (painel superior) e infectadas com *M. perniciosa* (painel inferior) aos 35 DAI



Foi realizada a avaliação da altura (cm) e diâmetro do caule (mm) de plantas MT, *green flesh*, *lutescent*, *sft* e *35S::SFT* infectadas ou não por *M. perniciosa* no tempo, para verificar os sintomas característicos da infecção (Figuras 44, 45 e 46). Aos 35 DAI, plantas *green flesh* e *sft* infectadas apresentaram redução significativa na altura em relação aos seus respectivos controles não infectados (Figura 45F). Em relação ao diâmetro do caule, principal sintoma característico da infecção, os mutantes *green flesh*, *lutescent*, *sft* e a linha transgênica *35S::SFT* apresentaram valores significativamente aumentados em relação aos respectivos controles não infectados (Figura 46F). Portanto, não foi possível observar alteração nos sintomas da infecção nos mutantes e linha transgênica em comparação com a infecção em MT, com avaliação no decorrer do tempo e somente quando comparando aos 35 DAI (Figura 46).

Figura 45 - Avaliação de sintomas da infecção por *M. perniciosa* em MT, *green flesh*, *lutescent*, *sft*, 35S::*SFT*. Altura de plantas A) MT, B) *green flesh*, C) *lutescent*, D) *sft*, E) 35S::*SFT* infectadas ou não por *M. perniciosa* aos 5, 15, 25 e 35 DAI. F) Altura de plantas MT, *green flesh*, *lutescent*, *sft*, 35S::*SFT* aos 35 DAI. Círculos preenchidos representam plantas não infectadas e círculos abertos representam plantas infectadas por *M. perniciosa*. Médias \pm erro padrão de 3 parcelas com 5 plantas ($n=15$). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$)

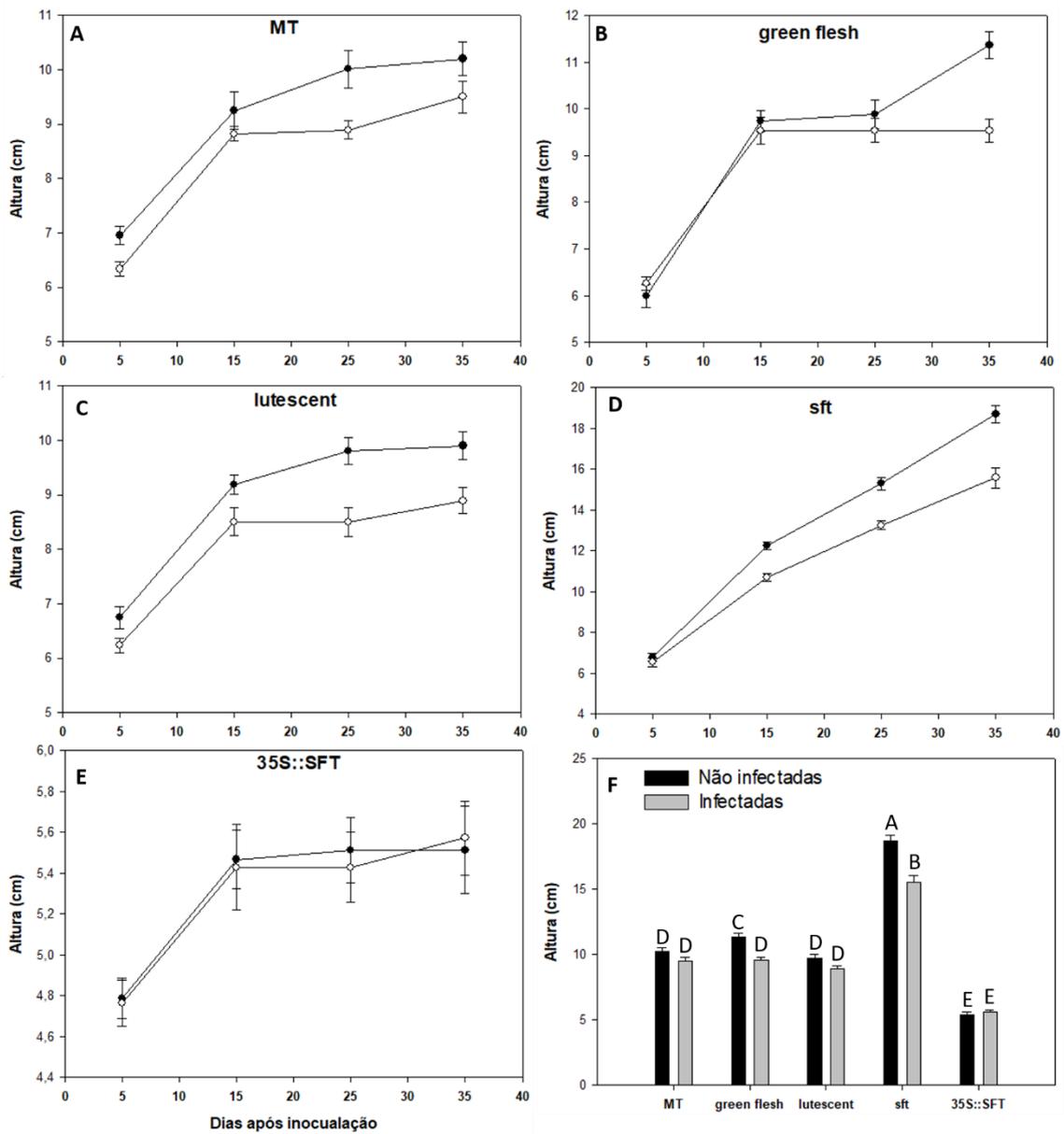
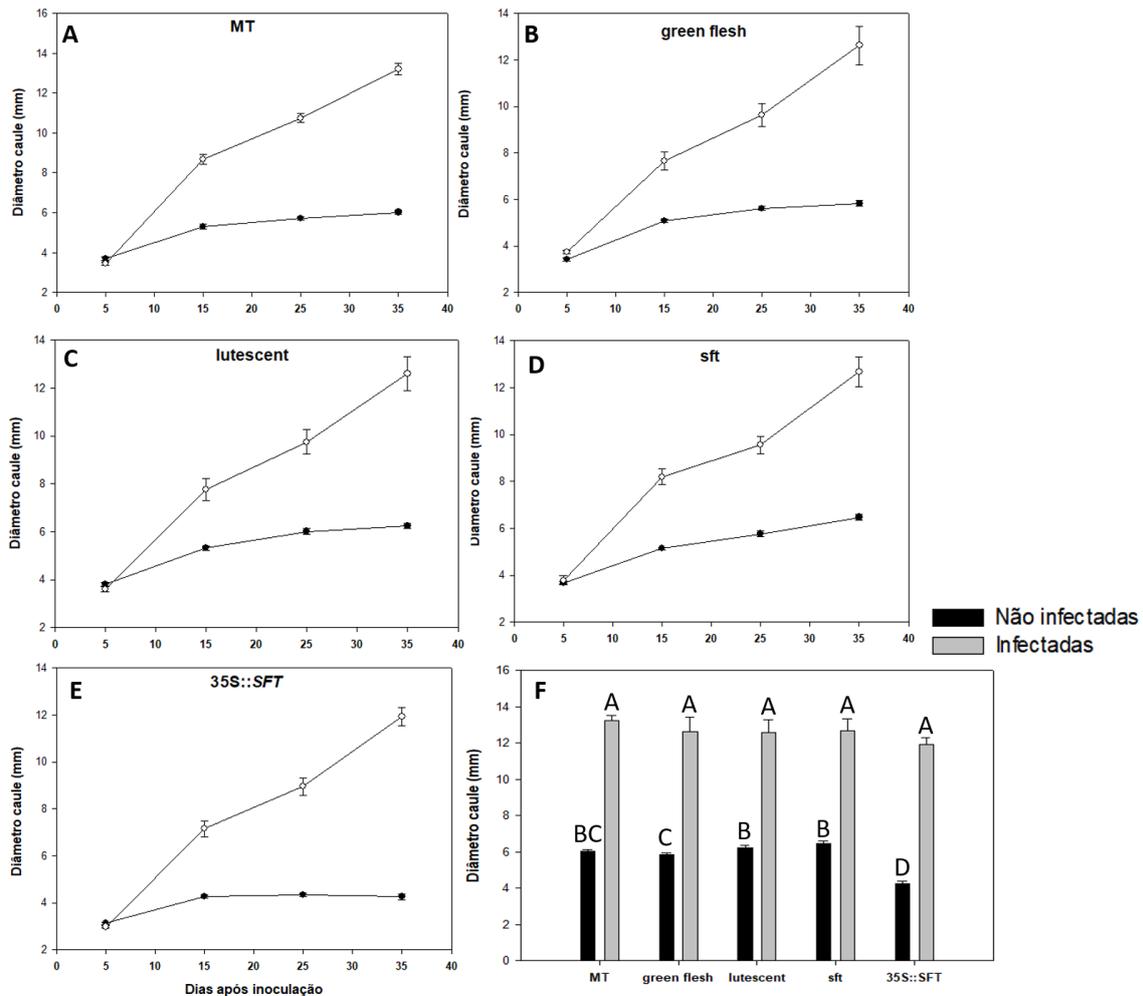


Figura 46 - Avaliação de sintomas da infecção por *M. perniciosa* em MT, *green flesh*, *lutescent*, *sft*, *35S::SFT*. Diâmetro do caule de plantas A) MT, B) *green flesh*, C) *lutescent*, D) *sft*, E) *35S::SFT* infectadas ou não por *M. perniciosa* aos 5, 15, 25 e 35 DAI. F) Diâmetro do caule de plantas MT, *green flesh*, *lutescent*, *sft*, *35S::SFT* aos 35 DAI. Círculos preenchidos representam plantas não infectadas e círculos abertos representam plantas infectadas por *M. perniciosa*. Médias \pm erro padrão de 3 parcelas com 5 plantas ($n=15$). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$)



Foi realizada a avaliação da biomassa de caules e raízes do mutante *sft* e transgênico *35S::SFT* infectados e não infectados aos 40 DAI, para a análise de outros sintomas decorrentes da infecção. Além disso, a análise de flores e frutos foi realizada com a finalidade de esclarecer como a infecção por *M. perniciosa* afeta o florescimento e desenvolvimento das flores nas plantas.

Plantas *sft* e *35S::SFT* infectadas aumentaram a biomassa da região com sintoma no caule (3 cm) em relação as plantas não infectadas (Figura 47A). No entanto, caules sem sintoma não apresentaram diferença significativa para massa seca em plantas *sft* infectadas em relação

as não infectadas (Figura 47B). Devido à altura reduzida de plantas *35S::SFT*, a massa seca das plantas foi avaliada somente para região com sintomas (3 cm). Curiosamente, a despeito dos valores de diâmetro de caule de *sft* infectados similares a MT infectados (Figura 46F), a massa seca da região com sintoma no caule (3 cm) aumentou significativamente em *sft* infectados em relação a MT infectados (Figura 47A).

Semelhantemente a plantas MT, *sft* infectados não apresentaram redução no comprimento de raízes em relação as plantas não infectadas, mas apresentaram redução de biomassa (Figura 48A e B). Por sua vez, a linha transgênica *35S::SFT* não apresentou diferença significativa nas medições para altura e massa seca de raízes (Figura 48A e B).

Figura 47 - Avaliação da massa seca de caules de MT, *sft* e *35S::SFT* após infecção por *M. perniciosa*. A) massa seca (g) região do caule com sintoma (3 cm) e B) massa seca (g) região do caule sem sintoma de plantas MT, *sft* e *35S::SFT* não infectadas e infectadas por *M. perniciosa*. Barras representam médias \pm erro padrão ($n=10$). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$)

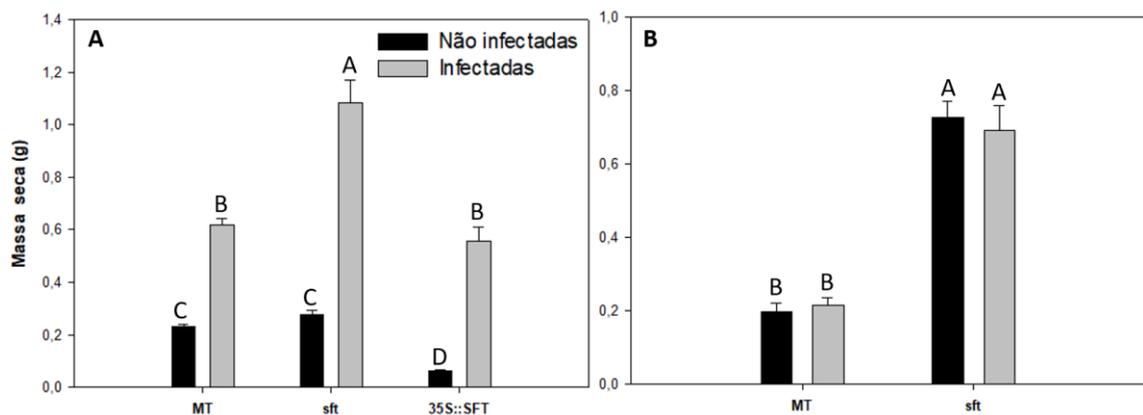
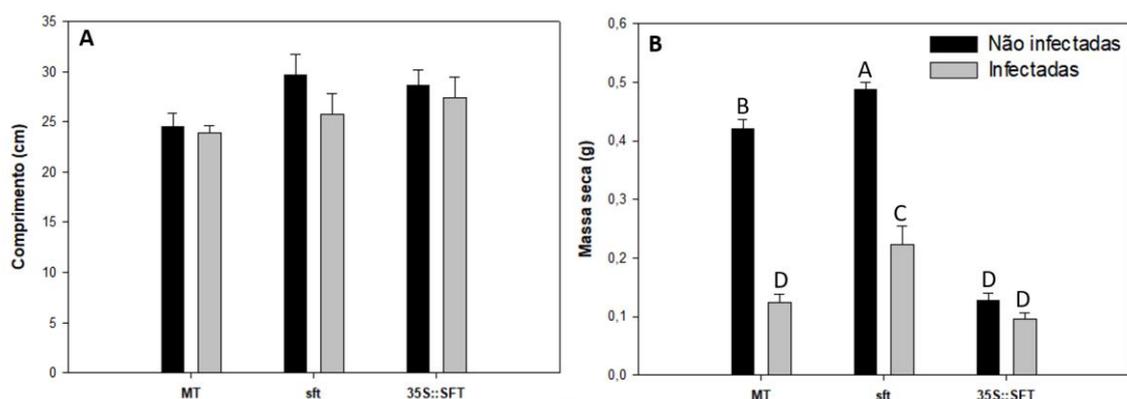


Figura 48 - Avaliação de raízes de plantas MT, *sft* e *35S::SFT* após infecção com *M. perniciosa*. A) Comprimento (cm) e B) massa seca (g) de raízes de plantas MT, *sft* e *35S::SFT* não infectadas e infectadas por *M. perniciosa*. Barras representam médias \pm erro padrão ($n=10$). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$)



Foi mostrado que plantas MT sofrem a transição de meristema vegetativo para reprodutivos aos 9 dias após germinação (Silva, 2016). Como plantas MT foram inoculadas com *M. pernicioso* 11 dias após a germinação, provavelmente o meristema já havia sido convertido em meristema reprodutivo. A avaliação do mutante *sft*, que atrasa o florescimento, poderia esclarecer se a infecção por *M. pernicioso* atrasa a indução do florescimento ou somente a formação de flores.

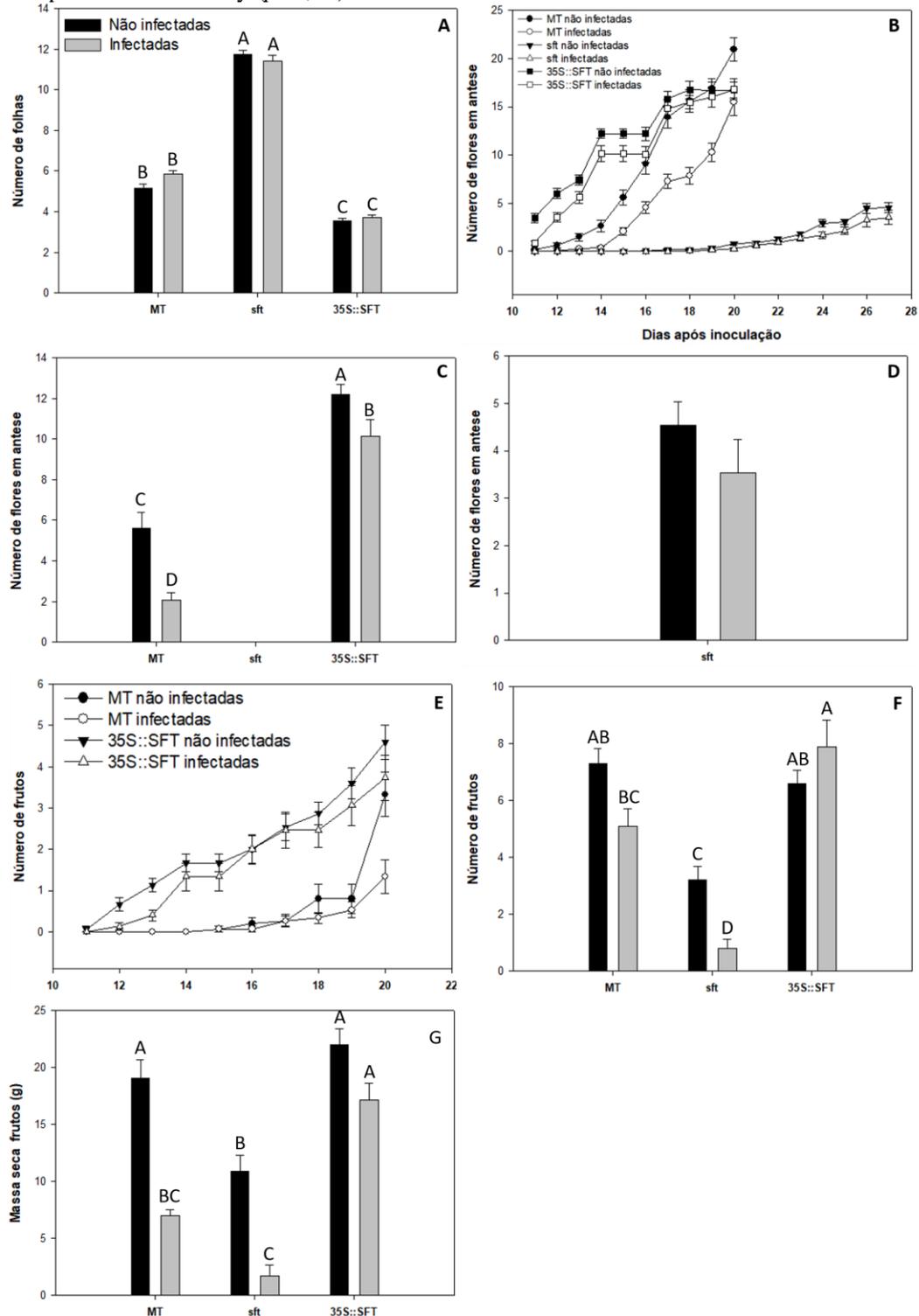
Para investigar o efeito da infecção de *M. pernicioso* no florescimento e no desenvolvimento de flores, o mutante *sft* e a linha transgênica *35S::SFT* foram analisados para número de folhas no eixo principal antes da primeira inflorescência, número flores em antese e número de frutos no tempo (Figura 49). Assim como em MT, *sft* e *35S::SFT* não apresentaram diferença estatística para número de folhas antes da primeira inflorescência com a infecção (Figura 49A). Visto que o mutante *sft* apresenta fenótipo de atraso no florescimento, muito provavelmente, na inoculação com *M. pernicioso* esse mutante ainda não havia feito a transição do meristema vegetativo para reprodutivo. Portanto, é possível sugerir que a infecção por *M. pernicioso* não afeta a transição do meristema vegetativo para meristema reprodutivo em MT.

No entanto, a infecção por *M. pernicioso* resulta no atraso do desenvolvimento de flores em MT e *35S::SFT*, mas não no mutante *sft*. Uma avaliação do número de flores em antese no tempo, com análise estatística no último tempo (20 DAI), indicou uma redução no número de flores em antese em MT e na linha transgênica *35S::SFT* infectados por *M. pernicioso* (Figura 49B e C). Já no mutante *sft* não foi possível observar diferença significativa no número de flores em antese no período analisado (27 DAI) (Figura 49B e D).

O desenvolvimento de frutos no tempo de plantas MT e *35S::SFT* infectadas também apresenta o mesmo padrão do desenvolvimento de flores (Figura 49E). Aos 40 DAI, foi possível observar uma redução significativa no número total de frutos no mutante *sft* infectado em relação ao não infectado, mas não em MT e *35S::SFT* infectados em relação a não infectados (Figura 49F). Com respeito à massa seca total dos frutos, foi observado uma redução em plantas MT e *sft* infectadas em relação a não infectadas, mas não na linha transgênica *35S::SFT* (Figura 49G).

Em resumo, a infecção por *M. pernicioso* no mutante *sft* e transgênico *35S::SFT* demonstrou que a infecção por *M. pernicioso* não altera a transição do meristema vegetativo para reprodutivo, isto é, não atrasa a indução do florescimento no *background* MT. No entanto, a infecção retarda o desenvolvimento de flores e frutos, levando a um número reduzido de frutos por planta.

Figura 49 - Avaliação de flores e frutos de plantas MT, *sft* e 35S::*SFT* após infecção com *M. perniciosa*. A) número de folhas no eixo principal das plantas antes da primeira inflorescência, B) número de flores em antese desde 11 DAI até 27 DAI, C) número de flores em antese de MT e 35S::*SFT* aos 20 DAI, D) número de flores em antese de *sft* aos 27 DAI, E) número de frutos desenvolvidos desde 15 DAI até 20 DAI, F) número de frutos aos 40 DAI e G) massa seca (g) de frutos de plantas MT, *sft* e 35S::*SFT* não infectadas e infectadas por *M. perniciosa*. Barras representam médias \pm erro padrão ($n=10$). Médias dos tratamentos seguidas por asterisco (*) são significativamente diferentes pelo teste *t* ($p \leq 0.05$) entre plantas infectadas em relação a não infectadas nas mesmas condições. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)



Os mutantes associados com o processo de senescência, *green flesh* e *lutescent*, foram mantidos em câmara de crescimento até os 90 DAI, para verificar se a precocidade de senescência de *lutescent* poderia causar algum efeito na transição de fase da infecção por *M. perniciosa* em MT. Foi demonstrado que a senescência prematura de cacaueiros infectados por *M. perniciosa* poderia ser um sinal para a transição da fase biotrófica para necrotrófica da infecção por *M. perniciosa* (Teixeira et al., 2014; Barau et al., 2014). Por esse motivo, *lutescent*, mutante de senescência precoce, poderia desencadear a transição da fase biotrófica para necrotrófica, o que não foi observado em MT (Deganello et al., 2014; Costa, 2017). No entanto, não foi possível observar necrose do tecido na região de sintomas. Ao contrário do esperado, aos 60 DAI, foi possível observar um possível atraso na senescência de plantas *lutescent* infectadas em relação as não infectadas (Figura 50), mas sem validade estatística. Já as plantas *green flesh* infectadas apresentaram o mesmo padrão de envelhecimento de MT infectadas, com senescência de galhos superiores, mas manutenção da coloração verde no caule aos 90 DAI (Figura 51). Além disso, não obstante ao atraso na senescência e aumento na produtividade de mutantes *green flesh* em algumas espécies de plantas, devido ao acúmulo prolongado de carboidratos (Watanabe et al., 2013), mutante *green flesh* introgridido em MT apresentou massa seca e número reduzido de frutos durante a infecção por *M. perniciosa* em comparação com seu respectivo controle, da mesma forma que MT infectado em relação ao não infectado (dados não mostrados).

Figura 50 - Representação de plantas *lutescent* A) não infectadas e B) infectadas por *M. perniciosa* aos 60 DAI

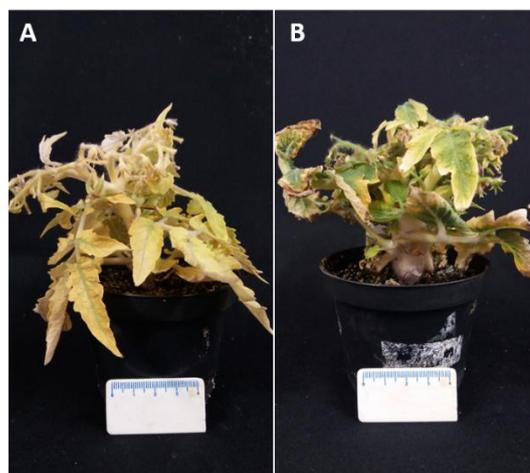
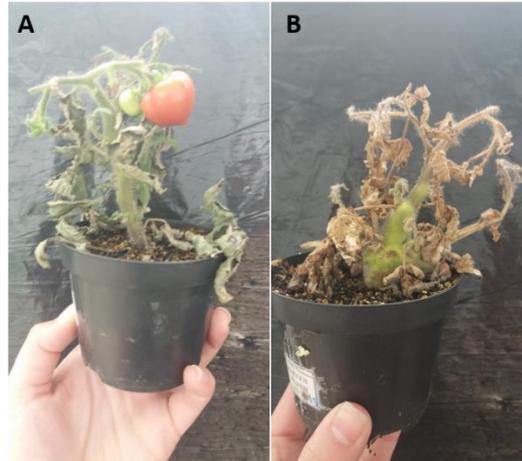


Figura 51 - Representação de plantas *green flesh* A) não infectadas e B) infectadas por *M. perniciosa* aos 90 DAI



5 DISCUSSÃO

5.1 A infecção por *M. perniciosa* promove o engrossamento do caule e redução de raízes de plantas MT

O uso de MT como sistema modelo no estudo da infecção pelo fungo basidiomiceto hemibiotrófico *M. perniciosa*, um patógeno que ataca o cacaueteiro, foi previamente estabelecido (Deganello et al., 2014). Os sintomas característicos da infecção por *M. perniciosa* em MT são engrossamento do caule, perda de dominância apical, formação de vassouras e indução de clorose nas folhas. Além disso, recentemente, a redução na biomassa de raiz e alteração no número de lóculos de frutos foram demonstradas após a infecção *M. perniciosa* em MT (Costa, 2017).

Nesse trabalho, a inoculação com *M. perniciosa* em MT levou à formação dos sintomas de engrossamento de caule e pecíolos, indução de clorose na folha adjacente à região de engrossamento do caule, engrossamento de pecíolos nas folhas mais expandidas, próximas à região de sintoma no caule, e engrossamento de pedúnculo floral, em geral resultante da formação da primeira inflorescência e redução de raízes. A avaliação da massa seca, somente na região do sintoma de engrossamento do caule, demonstrou que a biomassa dessa região é aumentada, quando comparando com a mesma região em plantas MT não infectadas. Além disso, a redução na massa seca de raízes, mas não do comprimento das mesmas, em plantas MT infectadas sugere que a infecção por *M. perniciosa* afete o desenvolvimento de raízes laterais, mas não da raiz principal. Acredita-se que as raízes laterais sejam responsáveis pela maior absorção de água nas raízes de plantas (Zarebanadkouki et al., 2014). Portanto, a alteração na biomassa de raízes de plantas MT infectadas por *M. perniciosa* poderia resultar na diminuição da absorção de água, prejudicando o balanço hídrico e, conseqüentemente, o metabolismo dessas plantas.

Nos resultados de massa seca relacionados à translocação de ^{14}C -glicose foi possível observar a redução na biomassa de raiz em plantas MT infectadas aos 4 DAI, período no qual os sintomas de engrossamento na parte aérea ainda não são visíveis. Possivelmente, o primeiro sintoma da infecção por *M. perniciosa* seja a redução na raiz e não o engrossamento do caule. Um estudo recente demonstrou que a alteração na sinalização pelos hormônios citocinina e auxina, decorrente da infecção por *M. perniciosa*, possa ter resultado na redução da biomassa das raízes (Costa, 2017), uma vez que o padrão de sinalização desses hormônios coordena o tamanho do meristema radicular e a taxa de crescimento de raízes (Loio et al., 2008). Além disso, auxina e citocina apresentam papéis antagônicos, regulando positivamente e

negativamente a organogênese de raízes laterais, respectivamente (Bielach et al., 2012). A redução da biomassa de raízes de MT após a aplicação com 20 mM de BA corrobora essa hipótese. Um estudo detalhado da alteração nas raízes de plantas infectadas está sendo conduzido paralelamente, com o objetivo de elucidar os fatores responsáveis por tal efeito.

5.2 A infecção por *M. perniciosa* induz alterações fisiológicas em plantas MT

A infecção por *M. perniciosa* levou à redução na taxa fotossintética (A) em folhas com sintoma (clorótica e encarquilhada) e sem sintoma (não clorótica), ao mesmo tempo em que a condutância estomática (g_s) e transpiratória (E) foram reduzidas em folhas com sintomas, mas não em folhas sem sintomas de plantas MT infectadas. O fechamento de estômatos é uma resposta comum em infecções, como parte da imunidade desencadeada por padrões moleculares associados a microrganismos (PAMPs), com o objetivo de limitar a entrada de patógenos (Kangasjarvi et al., 2012). Além disso, o hormônio ácido abscísico (ABA) possui um papel no fechamento de estômatos via reconhecimento de PAMPs (Lim et al., 2014). A superexpressão de receptores de ácido abscísico (ABA), *RCAR3*, *RCAR4* e *RCAR5*, induziram o fechamento de estômatos durante a infecção por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) *DC3000* e após o tratamento com PAMPs, levando à resistência a esse patógeno (Lim et al., 2014).

No entanto, as análises de trocas gasosas sugerem que a infecção por *M. perniciosa* resultou no aumento na concentração de CO_2 intercelular (C_i) em folhas com sintomas de plantas MT, de modo que a redução na taxa fotossintética (A) não tenha sido somente consequência do fechamento de estômatos, mas também por uma limitação na fixação de carbono no Ciclo de Calvin, possivelmente pela inibição de enzimas do ciclo.

Nos resultados do RNA-seq, foi possível observar, desde os 10 DAI com *M. perniciosa* em MT, a repressão de genes relacionados à fotossíntese. Diversos estudos relataram a redução nos níveis da taxa fotossintética após infecção por patógenos (Berger et al., 2004; Bonfig et al., 2006; Doehlemann et al., 2008; Rojas et al., 2014). Duas hipóteses tentam explicar os mecanismos para a redução da taxa fotossintética como consequência de infecção por patógenos: 1) supressão da fotossíntese desencadeadas por efetores do patógeno (Truman et al., 2006); ou 2) a redução da fotossíntese através da regulação por *feedback* por sinais de açúcares (Rojas et al., 2014).

A inoculação com *M. perniciosa* também reduziu os valores de potencial hídrico tanto em folhas com sintoma (cloróticas e encarquilhadas), como sem sintoma (não cloróticas), em relação às plantas não infectadas e, como consequência, a área foliar total de plantas MT.

Estudos de interação planta-patógenos demonstraram que a redução nos valores de potencial hídrico em plantas após a infecção por patógenos pode estar associada à defesa física e química em resposta a patógenos ou pela restrição do fluxo de água no xilema devido à presença do patógeno (Araujo et al., 2014).

Contudo, como discutido anteriormente, devido à redução na biomassa das raízes de plantas MT infectadas por *M. pernicioso*, a absorção de água pode ser prejudicada, resultando, ao menos parcialmente, na redução do potencial hídrico das folhas sintomáticas (cloróticas) e não sintomáticas (não cloróticas) de plantas infectadas em relação as folhas de plantas não infectadas. Sabe-se que plantas terrestres têm como maior fonte de água o solo. Para maximizar a absorção de água, as plantas desenvolveram raízes que se espalham pelo solo, a fim de aumentar o acesso à essa substância (Aung et al., 2018).

O fator amplamente associado ao estresse hídrico em plantas é a produção do hormônio ABA, o qual pode induzir o fechamento de estômatos para evitar perda de água por transpiração. O déficit de água em folhas promove a biossíntese, acumulação e redistribuição de ABA das raízes para as outras partes da planta através do xilema (Acharya & Assmann, 2009). Na indução do fechamento de estômatos, ABA se liga a seus receptores PYR/PYL/RCAR os quais levam à ativação de proteínas kinases SnRK2.6/OST1. Por sua vez, SnRK2.6/OST1 ativam NADPH oxidases, proteínas de canais de ânions SLAC1, SLAH1 e SLAH3 (Brandt et al., 2012) e uma aquaporina de membrana plasmática, AtPIP2;1 (Grondin et al., 2015). Mais recentemente foi demonstrado que, além de ABA, flg22, um padrão molecular associado a patógeno (PAMP), pode ativar AtPIP2;1 induzindo o fechamento de estômatos em *arabidopsis* (Rodrigues et al., 2017).

O déficit hídrico nas folhas decorrente da infecção por *M. pernicioso* em plantas MT poderia também induzir o fechamento de estômatos em plantas infectadas, visto que, recentemente, foi demonstrado que a infecção por *M. pernicioso* elevou os níveis de ABA em plantas MT aos 20 e 30 DAI (Costa, 2017). Possivelmente, o estresse hídrico causado pela diminuição na biomassa de raízes de plantas MT infectadas possa ter induzido a sinalização por ABA, levando ao fechamento de estômatos. Além disso, nos dados de RNA-seq da interação *M. pernicioso* x MT, foi observada a indução de receptores de ABA PYR/PYL/RCAR, de proteínas de canais de ânions SLAC1, SLAH1 e da aquaporina AtPIP2;1 (J. L. Costa, comunicação pessoal, 10 de janeiro de 2018), demonstrando a indução na via de sinalização por ABA para fechamento de estômatos em MT após a infecção por *M. pernicioso*.

Geralmente, a infecção por microrganismos causadores de galhas em plantas induz a formação de drenos nessas regiões, fornecendo água e nutrientes, por meio do sistema vascular, para os patógenos ali instalados (Dolzblasz et al., 2017). O desenvolvimento do tecido e diferenciação vascular durante o desenvolvimento de galhas são consequências da indução dos hormônios citocinina e auxina (Aloni et al., 2006). A infecção por *Rhodococcus fascians*, bactéria formadora de galhas, em arábida, promove a vascularização *de novo*, por meio da atividade do câmbio fascicular e interfascicular e transdiferenciação de células do parênquima dos tecidos condutores na região de sintomas. A vascularização dos tecidos foi correlacionada à sinalização por auxina, favorecendo o transporte de água e nutrientes à formação de galhas, mas não para as partes da planta acima à infecção (Dolzblasz et al., 2017). Um estudo recente com respeito à regulação hormonal na interação *M. pernicioso* x MT demonstrou que a infecção de MT por *M. pernicioso* promove a hipertrofia e hiperplasia de células do xilema, floema e córtex, devido à indução dos hormônios citocinina e auxina (Costa, 2017). Portanto, é possível supor que o aumento do xilema na região de engrossamento do caule em plantas infectadas promova a translocação aumentada de água nessa região.

Na infecção por *M. pernicioso* em MT, as análises de condutância e condutividade hidráulica na região de engrossamento do caule indicam o aumento na quantidade e velocidade de água translocada na região de sintomas da infecção. No entanto, a região do caule sem sintomas, acima do sintoma de engrossamento, em plantas infectadas, apresentou taxas de quantidade e velocidade de água translocada similares aos caules de plantas não infectadas. Possivelmente, a translocação aumentada de água ocorra majoritariamente para a região de infecção, mas desfavorecendo as partes acima. A redução no transporte de água para as folhas acima da região de engrossamento do caule poderia contribuir com a redução do potencial hídrico foliar observado em plantas infectadas.

Sabe-se que a água é essencial à sobrevivência de plantas e pré-requisito para o crescimento e proliferação dos microrganismos. No entanto, a maior parte dos microrganismos não apresentam mecanismos ativos de captação de água, mantendo sua turgescência através de substâncias osmóticas no citoplasma (Aung et al., 2018). Microrganismos patogênicos, como bactérias e fungos, podem causar lesões encharcadas de água em condições de alta umidade no ambiente (Johnson, 1937; Young, 1974; Xin et al., 2016). Por exemplo, o fungo patogênico biotrófico *Magnaporthe oryzae*, causador da doença brusone em arroz, promove a formação de lesões encharcadas na fase inicial da infecção (Ahn et al., 2005).

Um estudo com linhagens virulentas e avirulentas de bactérias revelou uma dinâmica distinta de água no apoplasto de folhas de arabis dependendo do modo de infecção. A linhagem virulenta *Pst* DC3000 resultou em um potencial hídrico favorável no apoplasto, enquanto que a linhagem avirulenta *Pst* DC3000 (*avrRpm1*) promoveu o estresse hídrico na planta resistente (Wright & Beattie, 2004). As lesões de encharcamento apareceram nos estágios iniciais da infecção e desapareceram antes da formação de sintomas mais tardios (Xin et al., 2016). Além disso, a infecção por uma linhagem avirulenta *Pst* DC3000 (*avrRpt2*) não induziu a formação de lesões encharcadas, sugerindo o bloqueio do processo de encharcamento como uma resposta de defesa da planta (Xin et al., 2016). Os efetores AvrE and HopM1 foram sugeridos como indutores da formação do apoplasto aquoso. O efector HopM1 é responsável por degradar *ARF-FAMILY GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR PROTEIN* (*AtMIN7*), envolvido no tráfico vesicular em plantas, alterando a integridade da membrana plasmática e, conseqüentemente, a disponibilidade de água por meio da formação de drenos osmóticos no apoplasto (Aung et al., 2018). Curiosamente, nos dados de RNA-seq das plantas MT infectadas por *M. perniciosa*, o gene *BREFELDIN A-INHIBITED GUANINE NUCLEOTIDE-EXCHANGE PROTEIN*, ortólogo de *AtMIN7* de arabis, foi reprimido as 12 horas após a inoculação (J. L. Costa, comunicação pessoal, 10 de janeiro de 2018), sugerindo que a alteração na integridade da membrana plasmática poderia afetar a disponibilidade de água no apoplasto de plantas MT infectadas, região na qual *M. perniciosa* se instala durante a infecção.

Outro exemplo de infecção que induz encharcamento na região de sintomas é pela bactéria *Xanthomonas gardneri*, que infecta o tomateiro. Durante a infecção, o efector AvrHah1, do tipo *TRANSCRIPTION ACTIVATOR-LIKE* (TAL), tem como alvo dois fatores de transcrição do tipo *BASIC HELIX-LOOP-HELIX* (*bHLH*). Por sua vez, a ativação desses fatores de transcrição leva à expressão dos genes *PECTATE LYASE* e *PECTINESTERASE* (Schwartz et al., 2016). Embora o papel do gene *PECTATE LYASE* no encharcamento ainda seja desconhecido, foi sugerido que mudanças nas propriedades da parede celular poderiam afetar a capacidade da parede celular em absorver água, levando ao acúmulo de água no apoplasto (Aung et al., 2018). Os dados de RNA-seq da interação *M. perniciosa* x MT revelaram a indução de ambos os fatores de transcrição *bHLH* e o gene *PECTATE LYASE*, envolvidos na indução de lesão de encharcamento na interação *Xanthomonas gardneri* x tomateiro, durante a infecção por *M. perniciosa* em MT, as 12 horas após a inoculação (J. L. Costa, comunicação pessoal, 10 de janeiro de 2018).

Além disso, o efector AvrB6 de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (*Xcm*) induz a expressão do transportador de açúcar *GhSWEET10* em algodão, levando à formação de sintomas de encharcamento na região de infecção (Cox et al., 2017). A indução de *GhSWEET10* favorece remobilização de açúcar para a região de sintomas não somente para favorecer a nutrição do patógeno, mas também para alterar o potencial osmótico no apoplasto, resultando em um apoplasto aquoso (Aung et al., 2018). O entendimento de como a disponibilidade de água em plantas altera as interações patógeno-hospedeiro é bastante relevante, embora ainda limitado, sobretudo para interações com fungo (Aung et al., 2018).

O potencial hídrico também apresenta grande relevância no desenvolvimento de plantas, como na expansão celular. Alguns patógenos podem excretar efetores, alterando a expressão de expansinas e proteínas induzidas por auxina, para indução de hipertrofia celular. Por exemplo, os fatores de transcrição *bHLH UPA20* induzidos pelo efector AvrBs3 de *Xanthomonas* em pimenta estão envolvidos na hipertrofia de células do mesófilo (Marois et al., 2002). O efector AvrBs3 induz a expressão de um regulador de tamanho celular, uPA20, o qual codifica para um fator de transcrição *BASIC HELIX-LOOP-HELIX DOMAIN (bHLH)* que induz a expressão de uma expansina (Kay et al., 2007). Em tomateiro MT, a infecção por *M. perniciosa* induz a hipertrofia e hiperplasia de células do xilema, floema e córtex (Deganello et al., 2014; Costa, 2017). Nos dados de RNA-seq foi observada a indução de fatores de transcrição *bHLH* (Soly03g097820.1) as 12 hpi e do gene *EXPANSINA 11* (Soly04g081870.3), ortólogo à expansina induzida em pimenta, as 24 hpi (J. L. Costa, comunicação pessoal, 10 de janeiro de 2018). Isso demonstra que, possivelmente, efetores de *M. perniciosa* possam induzir a expressão de expansinas para a promoção de hipertrofia celular.

Associando os dados de condutância e condutividade hidráulica do caule com os dados de RNA-seq, é possível sugerir que, no início da infecção, *M. perniciosa* possa sinalizar efetores para o encharcamento do apoplasto, com a indução de *bHLH* e *PECTATE LYASE* as 12 hpi, favorecendo seu desenvolvimento, e para a expansão celular, com a indução de *EXPANSINA 11* as 24 hpi, em MT. Assim, o aumento na translocação de água na região de sintomas no caule observado aos 35 DAI, pode favorecer o desenvolvimento de *M. perniciosa* e a expansão celular para o crescimento do tecido, uma vez que ciclinas e expansinas são induzidas em plantas infectadas as 12, 24 e 48 horas após a inoculação e aos 5, 10 e 20 e 30 DAI (J. L. Costa, comunicação pessoal, 10 de janeiro de 2018). Além disso, a translocação de água diminuída para regiões da planta acima da região de sintomas no caule, bem como o desenvolvimento deficiente de raízes laterais e o fechamento de estômatos pode promover a redução no potencial hídrico das folhas de plantas infectadas por *M. perniciosa*. Como resultado

do fechamento de estômatos e da inibição de enzimas da via do Ciclo de Calvin, a taxa fotossintética foi reduzida e, conseqüentemente ocorre a redução da área foliar total e biomassa de folhas, durante a infecção por durante a infecção por *M. pernicioso* em MT.

5.3 A infecção por *M. pernicioso* altera o metabolismo de plantas MT

Nesse trabalho, a combinação de duas técnicas, GC-MS-TOF e ¹H-NMR, foi utilizada com o objetivo de identificar uma ampla gama de metabólitos induzidos após a infecção de plantas MT com *M. pernicioso* ao longo do tempo. Logo no início da infecção, já foi possível observar algumas alterações metabólicas, com mudanças mais intensas conforme a severidade dos sintomas. Visando complementar a investigação das alterações metabólicas decorrentes da infecção de *M. pernicioso* em MT, foi feita uma busca nos dados de sequenciamento em larga escala (RNA-seq) realizado por uma integrante de nosso grupo de pesquisa (Costa, 2017), para avaliar a expressão de genes associados ao metabolismo primário de caules de plantas MT infectadas e não infectadas nos tempos 5, 10, 20 e 30 DAI.

5.3.1 Metabolismo de açúcares

Geralmente, o impacto da alteração no metabolismo primário causado pela infecção por patógenos é devido a três fatores: 1) a resposta de defesa do hospedeiro tem um custo elevado de energia; 2) o patógeno pode manipular o metabolismo do hospedeiro para disponibilizar nutrientes a seu favor; 3) o desenvolvimento de regiões cloróticas e ou/necróticas diminui a atividade fotossintética nas plantas hospedeiras (Fagard et al., 2014). No caso da infecção de *M. pernicioso* em MT, os três fatores podem estar acontecendo concomitantemente: a expressão de genes de defesa PR em plantas MT infectadas por *M. pernicioso* demonstra a resposta de defesa do hospedeiro para tentar conter a invasão por esse patógeno (Deganello et al., 2014); a indução de sintomas, como engrossamento do caule, após a infecção por *M. pernicioso* no meristema resulta da manipulação de vias hormonais (Costa, 2017) e do metabolismo a seu favor; folhas apresentando clorose são sintomas característicos da infecção de MT por *M. pernicioso*.

A infecção por patógenos em plantas afeta o metabolismo primário das mesmas, tendo em vista o custo energético elevado com respostas de defesa, bem como a manipulação do metabolismo pelo agente patogênico, desviando recursos para processos relevantes, como crescimento e reprodução (Rojas et al., 2014). Durante a infecção por *M. pernicioso* em MT, aos 10 DAI, quando os sintomas de engrossamento do caule são inicialmente visíveis, foi observada a redução de intermediários do Ciclo do Ácido Cítrico (TCA) e glicólise.

No entanto, aos 20 DAI, com a formação de sintomas mais severos, intermediários do ciclo TCA foram aumentados. O ciclo TCA está associado com os processos de respiração celular de plantas, que compreende três etapas: glicólise, TCA e cadeia de elétrons mitocondrial (Ferne et al., 2004), tendo como objetivo o fornecimento de energia e de esqueletos de carbono para a formação de metabólitos. Vale ressaltar que o Ciclo do Ácido Cítrico fornece energia redutora para o transporte de elétrons na cadeia de elétrons mitocondrial, a maior via produtora de energia para a célula.

O aumento na expressão de genes relacionados à respiração, incluindo a glicólise, TCA e cadeia mitocondrial de transporte de elétrons sugere uma adaptação ao consumo de energia excessivo nos tecidos infectados (Chandran et al., 2010; Kuhn et al., 2016). A infecção de plantas de arábido por *Phytophthora infestans* resultou no acúmulo de transcritos relacionados a processos envolvidos com produção de energia, como TCA, via das pentoses-fosfato, glicólise, cadeia de elétrons mitocondrial e biossíntese de ATP (Less et al., 2011). A acumulação de ácidos orgânicos do TCA em plantas MT infectadas por *M. perniciosus* aos 20 DAI demonstram um aumento no metabolismo respiratório das células dessas plantas, sugerindo o fornecimento de energia para sustentar a formação de um possível dreno ou mesmo o crescimento do patógeno. Ademais, as análises por GC-MS-TOF e ¹H-NMR demonstraram um aumento nos níveis de frutose e redução de sacarose, respectivamente. A redução nos níveis de sacarose e o não acúmulo de glicose podem estar relacionados a um aumento na necessidade energética dessas plantas, visto que parte dos açúcares pode estar envolvida na geração de energia (López-Gresa et al., 2010).

Um estudo da interação *B. cinerea* x tomateiro avaliou a participação dos açúcares glicose e frutose durante a infecção por esse patógeno (Lecompte et al., 2017). Plantas infectadas foram avaliadas em diversas condições de fornecimento de água, e foi observado que os conteúdos de frutose em caule aumentaram em todas as situações, enquanto que os conteúdos de glicose variaram conforme as condições impostas, sendo sugerido que o ajustamento da frutose está associado à redução da susceptibilidade de tomateiro à infecção por *B. cinerea* (Lecompte et al., 2017). Duas hipóteses foram elaboradas para explicar a participação diferenciada de glicose e frutose em resposta a infecções: 1) a indução de *SUCROSE SYNTHASE (SUSY)*, que quebra a sacarose em frutose e UDP-glicose; e 2) o uso diferencial de frutose e glicose no metabolismo dos tecidos, implicando nas atividades distintas de hexokinases e frutokinases (Lecompte et al., 2017). A infecção de MT por *M. perniciosus* resultou no acúmulo de frutose aos 20 DAI, mas não de glicose. Também foram observados níveis aumentados de UDP-glicose. Nos dados de RNA-seq não foi observada

alteração na expressão do gene *SUSY*. No entanto, a indução na expressão de uma *PHOSPHOTRANSFERASE*, ortóloga de *HEXOKINASE-LIKE 1 (HK1)* de arábida, indica que, possivelmente, a glicose, gerada pela quebra de sacarose em glicose e frutose, esteja sendo fosforilada a glicose-6-fosfato, a etapa precursora da via metabólica da glicose (Rojas et al., 2014).

Além disso, foi demonstrado que células de arábida desafiadas por *B. cinerea* apresentaram níveis reduzidos de hexoses, embora a absorção de hexoses tenha aumentado, considerando-se a indução de invertases e transportadores de hexoses (Veillet et al., 2017). Foi sugerido que o aumento no consumo de carboidratos pelas células promoveu a produção de energia para respostas de defesa, aumentando o fluxo das vias da glicólise e respiração celular (Veillet et al., 2017). Outros estudos também demonstraram que a indução de invertases em resposta à infecção por patógenos não está sempre associada ao acúmulo de hexoses no apoplasto das plantas. Nesse caso, foi demonstrado que os açúcares poderiam passar das células do hospedeiro para o patógeno sem se acumular, não formando *pools* de açúcares detectáveis (Yamada et al., 2016). Possivelmente, em plantas MT infectadas por *M. perniciosa*, a glicose pode estar sendo utilizada em vias de geração de energia, ou pode estar sendo consumida por *M. perniciosa* e, por esse motivo, seu acúmulo não foi detectado.

A acumulação de açúcares em plantas infectadas por patógenos tem sido extensivamente associada à formação de drenos de nutrientes nas regiões nas quais os patógenos se instalam (Schultz et al., 2013). Em cacau, um estudo bioquímico da infecção por *M. perniciosa* relatou o aumento nos níveis de glicose, sacarose e frutose em vassouras-verdes na fase biotrófica da infecção por *M. perniciosa* (Scarpari et al., 2005). Mais recentemente, açúcares do apoplasto foram isolados de vassouras-verdes de cacau infectados por *M. perniciosa*, exibindo um aumento no conteúdo de glicose e frutose, simultaneamente à redução nos níveis de sacarose (Barau et al., 2014). A repressão de genes relacionados à fotossíntese, bem como a indução de invertases de parede celular e transportadores de hexoses no transcriptoma da interação *M. perniciosa* x *T. cacao*, indicaram a formação de dreno nutricional em vassouras-verdes de cacau (Teixeira et al., 2014).

Na interação *M. perniciosa* x MT, a partir dos 20 DAI, foi observada uma reprogramação intensa do metabolismo primário em plantas infectadas, com a indução de genes associados à degradação, transporte e sensores e sinalizadores de açúcares.

Simultaneamente, a repressão de genes relacionados à fotossíntese das plantas e síntese de amido corroboram com um cenário comum em infecções por patógenos, no qual a dinâmica fonte/dreno das plantas é alterada, com a formação de um dreno competitivo na região de sintomas da infecção (Schultz et al., 2013).

Diversos estudos demonstraram a importância das invertases de parede celular na liberação de hexoses para o apoplasto (Veillet et al., 2016), com papel fundamental no descarregamento do floema, promovendo a formação de drenos (Berger et al., 2007). Em interações patógeno-hospedeiro, invertases de parede celular podem apresentar papel ambíguo. As invertases podem ser induzidas por elicitores de patógenos nas plantas hospedeiras, facilitando o consumo de hexoses pelo agente patogênico (Berger et al., 2004; Moghaddam & Van den Ende, 2012) ou favorecer o hospedeiro, uma vez que o catabolismo de açúcares é relevante no fornecimento de esqueletos de carbono e energia para a produção de compostos secundários, reforço da parede celular e sinalização para respostas de defesa em plantas infectadas (Berger et al., 2007).

Além disso, invertases de parede celular podem ser induzidas em resposta ao hormônio citocinina (Roitsch et al., 2003). A infecção de cotilédones de ervilha pela bactéria *Rhodococcus fascians* induziu a expressão dos genes da via da citocinina, *RfIPT*, *RfLOG* e *RfCKX*, e invertases e transportadores de açúcares, *PsCWINV*, *PsSUT* e *SWEET*, os quais são reguladores chave na dinâmica fonte dreno das plantas (Dhandapani et al., 2017). A interação entre citocininas e os genes *PsCWINV* e *PsSWEET* contribuíram para a perda de dominância apical e a formação de ramos nas plantas infectadas (Dhandapani et al., 2017), considerando-se o papel da sacarose na perda de dominância apical de plantas (Mason et al., 2014).

Possivelmente, o aumento da expressão do gene *INVERTASE 6*, uma invertase de parede celular, em caules de MT infectados por *M. pernicioso* em 20 DAI, seja resultado da indução por citocininas. Recentemente, foi demonstrado o papel das citocininas na patogênese de *M. pernicioso* durante a infecção em MT, com a expressão de genes de biossíntese de degradação de citocinina, e níveis elevados desse hormônio em plantas infectadas em relação as não infectadas (Costa, 2017). Esse hormônio foi, portanto, sugerido na formação de sintomas durante a infecção por *M. pernicioso*, como perda de dominância apical e engrossamento do caule e pecíolos de MT (Costa, 2017).

O aumento na translocação de ^{14}C glicose em plantas MT infectadas por *M. pernicioso* em relação as não infectadas indicou a possível formação de dreno de açúcares na região de sintomas (caule). Já as linhas transgênicas *At35S::CKX2* (com níveis reduzidos de citocinina) infectadas por *M. pernicioso*, que exibiram menor taxa de incidência de infecção e sintomas

reduzidos (Costa, 2017), não aumentaram a translocação de ^{14}C glicose para o caule. Por outro lado, a aplicação de citocinina sintética (20 mM de BA) resultou no aumento da translocação de ^{14}C glicose para todas as partes das plantas. Possivelmente, a citocinina esteja atuando na alteração do particionamento de açúcar, levando à formação de dreno na região de sintomas (caule) durante a infecção por *M. perniciosa* em MT.

Além da indução de uma invertase de parede celular, os dados de RNA-seq de MT infectado por *M. perniciosa* aos 20 DAI revelaram a indução de genes transportadores de açúcares *SUGAR TRANSPORTER (STP) 1* e *STP12*, corroborando a formação de dreno de açúcares na região de infecção (Buttner et al., 2010). Por exemplo, em sementes em desenvolvimento de *Vicia faba* a indução de *VfSTP1* desencadeia a divisão celular do tecido (Weber et al., 1997). A expressão de *SlSTP1* e *SlSTP2* em levedura demonstrou que esses transportadores de próton/hexoses na membrana plasmática são específicos de glicose e dependentes de energia (Gear et al., 2000).

Mais recentemente, a indução de *STPs* foi associada à recuperação de hexoses do apoplasto para favorecer as respostas de defesa do hospedeiro (Veillet et al., 2017). Em folhas de *Arabidopsis* infectadas por *B. cinerea*, foi relatada a expressão elevada do transportador de hexoses *STP13*. Linhas transgênicas superexpressando *STP13* apresentaram maior resistência à infecção por *B. cinerea*, enquanto que a perda de função desse gene resultou na susceptibilidade ao patógeno (Lemonnier et al., 2014). A indução de *STP13* favorece a captação de glicose celular, fornecendo energia necessária para resposta de defesa (Lemonnier et al., 2014). Da mesma forma, células de *Arabidopsis* desafiadas com *B. cinerea* induziram a expressão de transportadores de hexose *AtSTP1*, *-4*, *-13* (Veillet et al., 2017). Recentemente, foi demonstrado que *AtSTP13* possui um papel na resistência antibacteriana, atuando para privar o patógeno de nutrientes, por meio da remobilização das hexoses do apoplasto, e restringir seus fatores de virulência (Yamada et al., 2016).

Por outro lado, agentes patogênicos podem induzir a atividade de enzimas invertases, facilitando o consumo de hexoses (Roitsch et al., 2003). Acredita-se que durante infecções compatíveis causadas por fungos de ambos os estilos de vida, biotrófico ou necrotrófico, é definido um fluxo de hexoses a partir das células do hospedeiro, com destino ao patógeno, através da indução de transportadores de hexoses do patógeno (Dulermo et al., 2009). A análise transcrito de vassouras-verdes de cacauero infectadas com *M. perniciosa* revelou a indução de genes de *M. perniciosa* que codificam transportadores de hexose (Teixeira et al., 2014), sugerindo a captação desses açúcares pelo fungo. A análise funcional de transportadores de açúcares de patógenos em levedura revelou um mecanismo de transporte de hexose via

próton/simporte, específico para glicose e frutose (Schulze-Lefert & Panstruga, 2003). Além disso, a expressão de transportadores de hexoses *HXT1* em fungos mutualísticos e patogênicos demonstrou a preferência de hexoses como fonte de carboidrato para esses microrganismos (Lee et al., 2016).

Em um estágio mais avançado da infecção por *M. perniciosa* em MT, aos 30 DAI, genes associados ao transporte de açúcar, como *SUT1* e *SWEET1* foram reprimidos. Em arábido, milho e espécies de solanáceas, *SUT1* atuam como transportadores de sacarose com função de simportadores de prótons, com papel na importação de sacarose da parede celular nas células companheiras de elementos crivados para o carregamento do floema (Bezruczyk et al., 2018). Possivelmente, a repressão de *SUT1* em plantas MT infectadas por *M. perniciosa* seja uma estratégia para impedir o carregamento do floema com sacarose, mantendo esse açúcar restrito à região de infecção.

Por sua vez, *SWEET* são transportadores uniportes de hexoses e sacarose com papel crucial no efluxo celular de açúcares no floema (Bezruczyk et al., 2018). Os membros da família de proteínas *SWEETs* foram classificados em 4 clados filogenéticos. Os transportadores *SWEET1*, do clado I, transporta predominantemente hexoses (Chen et al., 2012). Diversos estudos têm demonstrado a indução da expressão de genes *AtSWEET* do clado III durante infecções por bactérias ou fungos biotróficos (Chen et al., 2010; Julius et al., 2017). Em arroz, agentes patogênicos controlam a regulação específica de genes *SWEET* visando à obtenção de carboidratos (Chen et al., 2010). Os genes *OsSWEET11*, *OsSWEET12* ou *OsSWEET14* foram induzidos em resposta à infecção por linhagens distintas de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) (Chen et al., 2010). A indução dos genes *SWEET* por efetores do tipo TALEs aumenta o fluxo de açúcares para o apoplasto, com o objetivo de nutrir bactérias patogênicas (Chen et al., 2010; Ding & Jones, 2017).

A expressão de *SWEETs* do clado I também foram investigados após a infecção por patógenos em plantas. O transportador de glicose de *Vitis vinifera* *VvSWEET4* foi induzido após a infecção por *B. cinerea*, sendo sugerido um papel como facilitador do efluxo de glicose na parede celular, colaborando com o crescimento do fungo patogênico (Chong et al., 2014). Além disso, em citros, a liberação do efector TAL por meio da infecção por *X. citri* estimulou a expressão de *CsSWEET1* (Hu et al., 2014). Pouco se sabe a respeito da repressão de genes *SWEET* em resposta ao ataque de patógenos. No entanto, acredita-se que a repressão de tais genes possa resultar na alteração de vias de sinalizações de açúcares (Julius et al., 2017). Possivelmente, a repressão dos genes *SWEET1* durante a infecção por *M. perniciosa* em MT, aos 30 DAI, seja uma estratégia do hospedeiro para a manutenção de

hexoses para as funções celular e, conseqüentemente, limitando açúcares no apoplasto para a nutrição de *M. perniciosa*.

Aos 30 DAI, foi também observada a indução de *TONOPLAST MONOSACCHARIDE TRANSPORTER 1 (TMT)* e *POLYOL MONOSACCHARIDE TRANSPORTER 5 (PMT)*. *PMT* são simportadores de prótons, capazes de transportar hexoses, pentoses e poliois (ex. manitol e sorbitol). Poliois são produtos da fotossíntese, podendo atuar como armazenamento de carbono em diversas espécies de plantas. Os poliois mais comuns são o sorbitol (forma reduzida da frutose), manitol (forma reduzida da manose) e dulcitol (forma reduzida da glicose). Além do papel como açúcares transponíveis através do floema, poliois apresentam características antioxidantes e osmoprotetores, podendo atuar em estresses bióticos em plantas (Stoop et al., 1996). Esses resultados sugerem a atuação de monossacarídeos e poliois na expansão celular do tecido e como osmoprotetores em células de plantas infectadas.

Além da indução de genes de quebra e transportadores de açúcares, os genes *TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE* e *PHOSPHOTRANSFERASE*, ortólogo do gene *HK1* de arábido, foram induzidos após a infecção por *M. perniciosa* em MT, aos 20 DAI. *TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE* pode atuar como um sensor de glicose e sacarose e na proteção de células e organelas contra desnaturação e senescência (Wingler et al., 2012). Trealose-6-fosfato (T6P) é um intermediário na biossíntese de trealose, um dissacarídeo não reduzido. Em plantas, existe apenas uma via de biossíntese para trealose, que inclui duas etapas: trealose fosfato sintase (tps), que sintetiza trealose-6-fosfato a partir de UDP-glicose e glicose-6-fosfato, e trealose fosfato fosfatase (tpp), que desfosforila o intermediário trealose-6-fosfato (Eastmond & Graham, 2003). Apesar do papel de T6P como um sensor da disponibilidade de sacarose, T6P também regula negativamente os níveis de sacarose, restringindo a síntese desse açúcar ou promovendo seu consumo/degradação (Yadav et al., 2014). Embora não tenha sido observado o acúmulo de trealose ou T6P nesse trabalho, foi demonstrado que a ativação transcricional da via de biossíntese de trealose leva ao acúmulo desse açúcar não-reduzido em plantas (Truman et al., 2006).

Não obstante ao papel das hexokinases como fosforiladores de glicose, formando glicose-6-fosfato, essa enzima tem função como um sensor de glicose (Moore et al., 2003; Cho et al., 2009). A expressão de *AtHXK1* em tomateiro levou à redução na taxa fotossintética, inibição de crescimento e indução de senescência (Dai et al., 1999). Aparentemente, o papel de *HK1* na resposta de defesa a patógenos possui um papel ambíguo, dependendo do órgão infectado estudado e do agente patogênico. Em arábido, a indução dos genes *PR-1* e *PR-5*

por glicose foram dependentes de *HEXOKINASE 1* (Xiao et al., 2000). No entanto, em *Nicotiana benthamiana*, o silenciamento de HK1 induzida por vírus (VIGS) resultou no aumento dos níveis de H₂O₂, bem como na indução de transcritos associados à resposta de defesa (Kim et al., 2006).

Ademais, a infecção por *M. pernicioso*, aos 10 DAI, levou ao aumento nos níveis de rafinose, em comparação com plantas não infectadas. Rafinose é um carboidrato sintetizado pela conjugação de sacarose e galactinol. Rafinose e galactinol são compostos ubíquos em plantas, podendo atuar como sinalizadores ou como neutralizadores de ROS, quando em altas concentrações (Foyer et al., 2011). Além disso, a rafinose pode funcionar como um estabilizador de membrana e como sinal transponível via floema, mediador de resposta a estresse (Van den Ende, 2013). Durante a invasão do nematoide *Syncytia* em arábido, foi observado o aumento de pequenos oligossacarídeos como 1-kestose e rafinose, bem como o dissacarídeo trealose e galactinol (Hofmann et al., 2010). O acúmulo de 1-kestose e rafinose em partes não infectadas das plantas, sugere que esses oligossacarídeos possam atuar como sinais de estresse transponíveis sistêmicos (Moghaddam & Van den Ende, 2012). A acumulação de rafinose pode ser mais uma estratégia para reduzir os danos celulares na planta infectada (Schacker et al., 2016).

Portanto, foi observado inicialmente uma diminuição de metabólitos associados à respiração, mas um aumento no metabolismo respiratório e a indução de genes de degradação, transporte e sinalização de açúcares aos 20 DAI. Isso demonstrou uma alta demanda de energia e a realocação de carbono, indicando o fornecimento de energia para sustentar a formação de um possível dreno. A invertase de parede celular associada à formação de dreno foi possivelmente induzida pelo acúmulo de citocinina na região de infecção, considerando-se as análises de translocação de ¹⁴C glicose em MT e 35S::*AtCKX2*. As hexoses liberadas no apoplasto de plantas MT infectadas podem estar sendo utilizadas por três possíveis maneiras: 1) pelo consumo do patógeno, 2) recuperadas pela célula para entrar nas vias de glicólise e TCA para produção de energia, 3) para expansão e divisão celular do tecido e 4) como resposta de defesa de MT para privar *M. pernicioso* de açúcares. O acúmulo de frutose, mas não de glicose nos tecidos infectados sugere que a glicose está sendo utilizada nas vias de geração de energia, tendo em vista a indução de uma fosforilase, ou pode estar sendo consumida por *M. pernicioso* e, por esse motivo, seu acúmulo não foi detectado. Aos 30 DAI, Possivelmente, a repressão de *SUT1* em plantas MT infectadas por *M. pernicioso* seja uma estratégia para impedir o carregamento do floema com sacarose, enquanto que a repressão de *SWEET1* seja uma estratégia do hospedeiro para a manutenção de hexoses para as funções celulares e limitando

açúcares no apoplasto para a nutrição de *M. pernicioso*. Por fim, a indução de *TMT* e *PMT* sugerem a atuação de monossacarídeos e poliois na expansão celular do tecido e como osmoprotetores em células de plantas infectadas.

5.3.2 Metabolismo de aminoácidos

A alteração no metabolismo primário de plantas em resposta à infecção por patógenos também é influenciada pelo balanço de nitrogênio (Ward et al., 2010). Aos 4 DAI foi possível notar uma pequena alteração no metabolismo de aminoácidos por meio dos dados de metabolômica, com níveis elevados de metionina e valina em plantas infectadas em relação as não infectadas. O acúmulo de metionina, seguido de seu catabolismo, pode ocorrer para alimentar a via TCA, contribuindo com a energia metabólica celular (Kirma et al., 2012). Por sua vez, a valina, além de apresentar um papel importante no balanço de nitrogênio de plantas, participa da via de glicogênese e é um intermediário do ciclo TCA, auxiliando, por exemplo, na respiração em frutos de tomateiro (Kochevenko et al., 2012). O aumento nos níveis de valina em plantas da variedade de arroz (*Oryza sativa*) ‘Thai Jasmine’, quando atacadas por *Nilaparvata lugens*, foi sugerido como resposta ao estresse, mas não foi atribuído um papel no mecanismo de resistência a esse inseto (Uawisetwathana et al., 2015).

Com respeito à alteração de aminoácidos resultante da infecção por *M. pernicioso* em MT aos 20 DAI, os níveis de prolina e fenilalanina foram reduzidos, enquanto que o conteúdo de glutamato, serina e aspartato foi aumentado. A prolina é um aminoácido frequentemente acumulado em plantas em situações de estresse, funcionando como um soluto compatível que tem como papel adaptar o estresse osmótico e estabilizar membranas e componentes subcelulares (Fabro et al., 2004). Esse aminoácido também apresenta função como um neutralizador de ROS, com papel na proteção de hospedeiros contra infecções por patógenos (Fabro et al., 2004; Zeier, 2013). A degradação da prolina ocorre na mitocôndria em duas reações que envolvem, inicialmente, a enzima proline dehydrogenase (ProDH), formando 1-Pyrroline-5-carboxylic acid (P5C) e transferindo elétrons para a ubiquinona na cadeia de elétrons mitocondrial. Em seguida, pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase oxida P5C a glutamato (Rizzi et al., 2017). A diminuição nos níveis de prolina durante a infecção por *M. pernicioso* corrobora os dados do transcriptoma, nos quais observa-se a indução de *PROLINE DEHYDROGENASE (ProDH)*, gene ortólogo de *ProDH2* de arábidoopsis. Em arábidoopsis, *ProDH1* é expresso em quase todos os tecidos e estágios de desenvolvimento em grande intensidade, enquanto que *ProDH2* é expresso em baixos níveis, sobretudo em tecidos vasculares e folhas senescentes (Funck et al., 2010).

Em milho, foi demonstrado que a formação de H_2O_2 resulta na diminuição da atividade da enzima *ProDH* e, conseqüentemente, em altos níveis de prolina (Yang et al., 2009). Slisz et al. (2012) reportaram a diminuição nos níveis de prolina em plantas de citros infectadas pelo patógeno *Candidatus Liberibacter*, sugerindo que, possivelmente, a bactéria patogênica esteja suprimindo as respostas de defesa da planta, como a defesa relacionada à liberação de H_2O_2 . Por outro lado, a infecção de arábidoopsis com uma linhagem avirulenta de *P. syringae* resultou na acumulação de transcritos *ProDH1/2* em regiões da folha que sofreram resposta de hipersensibilidade, mas não no tecido ao redor, enquanto que o silenciamento de *ProDH* resultou na atenuação do estresse oxidativo (Cecchini et al., 2011). Nesse caso, a via de catabolismo de prolina por ProDH na mitocôndria é uma das fontes de ROS durante a infecção não compatível (avirulenta) em arábidoopsis (Cecchini et al., 2011). Da mesma forma, a interação do patógeno virulento *Pst-AvrRpm1* x arábidoopsis induziu a expressão de *ProDH* em folhas, com conseqüente redução nos níveis de prolina, levando à formação de ROS para a resposta de hipersensibilidade (Monteoliva et al., 2014).

A infecção por *B. cinerea*, um patógeno necrotrófico, no mutante *prodh* apresentou maior susceptibilidade à infecção em comparação a plantas controle, e o micélio do fungo se expandiu mais rapidamente no mutante *prodh2-2*, sugerindo um papel de *ProDH2* na proteção contra a penetração de *B. cinerea* por meio da produção de ROS (Rizzi et al., 2017). A combinação de ambas as enzimas ProDH1 e ProDH2 poderia resultar na resistência completa à infecção. No entanto, ProDH2 apresentou um efeito maior na restrição antecipada do crescimento de *B. cinerea* (Rizzi et al., 2017).

A diminuição nos níveis de prolina em plantas MT infectadas por *M. perniciosa* corrobora o aumento nos níveis de glutamato. Em plantas, a assimilação de nitrogênio geralmente ocorre a partir da produção de glutamato por glutamina na via GS/GOGAT, aonde glutamato pode formar aspartato e, em seguida, asparagina, através do processo de transaminação para a biossíntese de aminoácidos e, também contribuindo com a produção de energia através do ciclo TCA (Coruzzi, 2003). Os aminoácidos glutamato, asparagina e glutamina, foram acumulados após a infestação de arroz pelo inseto *Nilaparvata lugens*, sugerindo um papel na assimilação de nitrogênio, na via de produção de GABA e via de glicogênese (Uawisetwathana et al., 2015). Além disso, como resultado de estresses bióticos, acredita-se que o acúmulo desses aminoácidos seja conseqüência da produção de ROS, que resulta em altos níveis de amônia nas células das plantas. Assim, para diminuir os níveis desses compostos tóxicos, glutamato e asparagina são utilizados na assimilação de nitrogênio e transaminação de amônia (Uawisetwathana et al., 2015).

O aminoácido aspartato também foi associado às plantas infectadas por *M. pernicioso*, pelos dados de RMN. Em tecidos de cana de açúcar infectados pelo fungo patogênico *Sporisorium scitamineum*, causador da doença carvão da cana, o acúmulo de aspartato em tecidos infectados foi correlacionado à translocação de nitrogênio para tecidos dreno das plantas (Schaker et al., 2017). Além disso, o aspartato também apresenta um papel na produção de nucleotídeos, pela via de biossíntese *de novo* (Zrenner et al., 2006).

A redução nos níveis de prolina e aumento de glutamato corroboram o aumento nos níveis de GABA em plantas MT infectadas, uma vez que a síntese de GABA compete pelo mesmo substrato que uma enzima do metabolismo de prolina e pode ser produzido por glutamato. GABA é um aminoácido não proteico que se acumula em plantas em resposta a estresses bióticos e abióticos. Em estresse bióticos, GABA foi sugerido como um possível sinalizador na resposta de defesa de plantas, com função na prevenção de acumulação de ROS e morte celular. Além disso, esse aminoácido, aparentemente, possui um papel nutricional, como uma potencial fonte de carbono (succinato) e nitrogênio (alanina/glutamato) para a multiplicação de *P. syringae* (Ward et al., 2010). O patógeno *C. fulvum* que infecta tomateiro foi capaz de utilizar GABA como fonte de nitrogênio durante seu crescimento em meio de cultura, assim como quando crescido em meio com aspartato e glutamato (Solomon & Oliver, 2001). Além disso, GABA também pode apresentar um papel como osmoprotetor em células sob estresse, assim como beta-alanina e rafinose (Obata & Fernie, 2012).

Aos 30 DAI, foi observada a indução de uma asparaginase, enzima que catalisa a hidrólise do grupo amida da asparagina, liberando aspartato e amônia (Lea et al., 2007). A asparaginase pode apresentar papel importante no fornecimento de nitrogênio para tecidos dreno e na remobilização de asparagina livre que se acumula em resposta ao estresse ou à deficiência de nutrientes (Curtis et al., 2018). Após a infecção por *M. pernicioso*, vassouras-verdes de cacau acumularam o aminoácido asparagina, sugerindo um processo de senescência do tecido infectado (Scarpari et al., 2005), corroborando a indução de *ASPARAGINE SYNTHETASE*, que promove a incorporação de nitrogênio em aspartato para formar asparagina (Teixeira et al., 2014).

Além disso, a asparaginase também foi associada ao catabolismo de asparaginas resultantes da degradação de proteínas em órgãos fontes, sendo essas últimas a maior fonte para translocação de nitrogênio em folhas senescentes (Mae et al., 1985). Por exemplo, a enzima Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) foi considerada uma fonte importante de nitrogênio para translocação (Mae et al., 1985). Considerando-se que a grande quantidade de resíduos de asparagina nas subunidades pequenas e grandes das

Rubiscos, essas asparaginas podem ser substrato para ASNase2 durante a senescência de folhas de arroz (Yabuki et al., 2017).

Como discutido anteriormente, em plantas MT infectadas por *M. pernicioso*, as folhas desenvolvidas na altura na região do engrossamento do caule, desenvolvem clorose e encarquilhamento. Portanto, considerando-se a repressão subunidade da Rubisco, de glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, que catalisa a reação de conversão de 1,3 bifosfoglicerato em 3 glyceraldeido 3 fosfato e dos genes associados ao fotossistema I e II, nos dados de RNA-seq de plantas MT infectadas por *M. pernicioso*, é possível sugerir que a indução de asparaginase possa estar associada à degradação de asparagina resultante da degradação de enzimas Rubisco, aos 30 DAI.

Portanto, a oxidação da prolina observada em tecidos de MT infectados por *M. pernicioso* sugere uma possível contribuição para o fornecimento de elétrons para a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, bem como a formação de ROS, como sinalização ou tentativa de contenção do patógeno. O acúmulo dos aminoácidos glutamato e aspartato pode estar associado à translocação de nitrogênio para tecido dreno das plantas hospedeiras e nas vias de produção de GABA e de glicogênese e contribuindo energia para o ciclo TCA. Por sua vez, o acúmulo de GABA sugere sua atuação como sinalizador contra a invasão pelo patógeno e como osmoprotetor, mas também como fonte de nitrogênio ao consumo de *M. pernicioso*.

5.3.3 Fotorrespiração

A redução de ácido glicólico no início da infecção e o acúmulo dos aminoácidos serina e glicina nos estágios mais avançados da infecção por *M. pernicioso* em plantas MT infectadas pode estar relacionada à indução da via de fotorrespiração. A fotorrespiração representa um ponto de convergência entre o metabolismo de carboidratos e de aminoácidos, uma vez que o metabólito fosfoglicolato é utilizado na produção dos aminoácidos serina e glicina. Além de funcionar como uma via de resgate de carbono para evitar sua perda, a fotorrespiração também está envolvida com a defesa contra patógenos (Rojas et al., 2014).

A alteração nas taxas de fotorrespiração celular pode afetar a acumulação de ROS em células de plantas infectadas, sobretudo nos peroxissomos, onde o ácido glicólico é oxidado, produzindo níveis elevados de H₂O₂, como parte da via de reciclagem de carbono da fotorrespiração. O aumento nas taxas de fotorrespiração durante a infecção por patógenos está associado à acumulação de ROS, ativando reações relacionadas à defesa contra patógenos (Kangasjärvi et al., 2012).

5.3.4 Metabolismo de poliaminas

Desde os 10 DAI, a infecção por *M. pernicioso* resultou no aumento nos níveis de poliaminas, como putrescina e esperdimina. A indução de poliaminas em infecções causadas por agentes biotróficos está frequentemente relacionada à formação de ‘ilhas-verdes’ ao redor de regiões de sintomas. ‘Ilhas-verdes’ são regiões metabolicamente ativas induzidas pela infecção de agentes patogênicos biotróficos e hemibiotróficos, por meio do aumento na concentração local de citocinina, para absorver mais nutrientes e retardar a senescência desse tecido (Walters et al., 2008). Cheng & Kao (1983) descreveram o efeito da aplicação de poliaminas com efeito similar ao da citocinina no retardamento da senescência em plantas. Na formação de ‘ilhas-verdes’ promovidas pela ferrugem amarela em folhas de trigo, cujo agente etiológico é o fungo *P. triformes*, a razão síntese/degradação de clorofila foi alterada, e a aplicação exógena de esperdimina, putrescina e espermina promoveu o retardamento da degradação de clorofila (Aldesuquy et al., 2000).

Diversos estudos demonstraram que a infecção de plantas por patógenos pode levar ao acúmulo de poliaminas. A infecção pelo fungo patogênico *Blumeria graminis f. sp. hordei* (Coghlan & Walters, 1990) resultou no aumento nos níveis de poliaminas em plantas de cevada. O acúmulo de poliaminas em folhas de cevada infectadas com *B. graminis f. sp. hordei* foi correlacionado ao aumento nos transcritos dos genes *ARGININE DECARBOXYLASE (ADC)*, *ORNITHINE DECARBOXYLASE (ODC)* e *S-ADENOSYLMETHIONINE DECARBOXYLASE* (Cowley & Walters, 2002).

No entanto, o acúmulo de poliaminas como resultado da infecção por patógenos pode também estar associado ao combate à infecção. A interação do fungo patogênico *Fusarium* x linho levou ao aumento no conteúdo de poliaminas em plantas infectadas, sobretudo na fração ligada à parede celular, bem como de enzimas da via de síntese das poliaminas (Wojtasik et al., 2015). Os autores sugeriram uma participação das poliaminas no rearranjo de arquitetura das paredes celulares, fortalecendo as conexões entre seus componentes e, conseqüentemente, agindo como uma barreira física contra a invasão do agente patogênico. Também foi demonstrado um efeito inibitório de poliaminas livres no crescimento do fungo, sugerindo um papel desses compostos na defesa do hospedeiro (Wojtasik et al., 2015).

Nas análises de RNA-seq de plantas MT infectadas com *M. pernicioso* aos 20 DAI, foi observada a indução do gene *ARGININE DECARBOXYLASE 1*, que codifica uma enzima chave na produção de poliaminas pela via da arginina. O gene *POLYAMINE OXIDASE (PAO)*, que leva à formação de 4-aminobutanal, composto que atua na via de lignificação por meio de poliaminas (Wojtasik et al., 2015), também foi induzido nesse tempo. Curiosamente, foi observada uma forte repressão do gene *SPERMIDINE*

HYDROXYCINNAMOYL TRANSFERASE, com função na conjugação de *feruloil-CoA* à espermidina, o que pode ser resultado de uma estratégia de *M. pernicioso* para limitar a produção de compostos N1,N5,N10-triferuloyl-spermidinam, acumulando espermidinas livres aos 10 e 20 DAI.

Alguns estudos demonstraram que *PAO* contribui na resposta de defesa contra patógenos no apoplasto por meio da produção de H_2O_2 (Cona et al., 2006). Plantas de tabaco resistentes à infecção pelo vírus mosaico do tabaco (TMV) apresentaram expressão aumentada de *PAO*, simultaneamente com o acúmulo poliaminas, em tecidos que exibem resposta de hipersensibilidade (Yoda et al., 2003). Posteriormente, foi demonstrada a contribuição de H_2O_2 na resposta de hipersensibilidade em tabaco com resistência não-hospedeiro à infecção por *Pseudomonas cichorii*, sendo sugerido que o H_2O_2 produzido pela indução de *AMINO ACID OXIDASE (DAO)* e *PAO* pode ser utilizado pelas peroxidases para o fortalecimento e lignificação da parede celular (Yoda et al., 2009). As poliaminas estão associadas aos polissacarídeos pectina e no controle de deposição de lignina (Wojtasik et al., 2015), sendo sugerido um papel na resistência por penetração. De acordo com essa hipótese, poliaminas e a indução de *PAO* foram sugeridas como parte na resposta de resistência de pré-penetração e penetração no patossistema da *Puccinia coronata Cda. f.sp. avenae* x aveia (Montilla-Bascón et al., 2016).

Recentemente, foi mostrado que a infecção de *M. pernicioso* em tomateiro MT se caracteriza como uma quebra de resistência não-hospedeiro (*non-host*) pelo biótipo-S (Deganello et al., 2014). A superexpressão de um gene anti-apoptótico de cacau, *BAX-INHIBITOR-1 (TcBI-1)* em tomateiro MT, afetou a penetração de esporos germinativos, restaurando parcialmente a resistência não-hospedeiro do biótipo S em MT (Scotton et al., 2017).

Por sua vez, em cacau foi mostrado que a produção espécies reativas de oxigênio (ROS) em tecidos infectados por *M. pernicioso* biótipo-C promove um ambiente oxidativo para tentar bloquear o desenvolvimento do fungo (Scarpari et al., 2005; Ceita et al., 2007). Além disso, o transcriptoma da interação *M. pernicioso* x *T. cacao* revelou a superexpressão de *NADPH OXIDASES* em vassouras-verdes de cacau, contribuindo com a geração de estresse oxidativo durante a infecção pelo patógeno (Teixeira et al., 2014). A investida não parece ser bem-sucedida, uma vez que *M. pernicioso* possui genes, como catalases e tiorredoxina, que codificam para enzimas capazes de decompor ROS (Mondego et al., 2008; Teixeira et al., 2014).

Portanto, inicialmente a acumulação de poliaminas durante a infecção por *M. pernicioso* em MT pode contribuir com a manutenção de dreno de nutrientes, bem como com o atraso na senescência do tecido. No entanto, tendo em vista a indução de PAO, a oxidação de poliaminas indica a produção de ROS no tecido infectado, ativando uma via de lignificação por poliaminas. A indução de ROS na oxidação de poliaminas, prolina e na via de fotorrespiração pode atuar nas respostas de defesa na tentativa de conter a infecção por *M. pernicioso*, como reportado em cacauero (Ceita et al., 2007; Teixeira et al., 2014). Além disso, inicialmente, a lignificação do tecido de MT pode ser uma tentativa de contenção contra a penetração do patógeno, ainda que mal-sucedida. Vale ressaltar que, embora vias de produção de ROS tenham sido propostas nesse trabalho, em MT não é observada a necrose do tecido, como em cacauero. No entanto, outra possibilidade para a lignificação do tecido seja a necessidade de consumo de lignina por *M. pernicioso*, após a morte celular do tecido na sua fase necrotrófica, uma vez que a grande maioria dos fungos pertencentes à família de *M. pernicioso* são saprotroficos.

5.3.5 Metabolismo de nucleotídeos

A infecção por *M. pernicioso* em MT induziu a formação nos nucleosídeos adenosina e uridina. O metabolismo de nucleotídeos é essencial à vida dos organismos, incluindo as plantas, uma vez que apresentam papel como provedores de energia, para a produção de ácidos nucleicos e como precursores de para a biossíntese do hormônio citocinina (Daumann et al., 2015). No presente trabalho, a acumulação de adenosina, como precursor de citocininas é bastante presumível, uma vez que, recentemente, elevados níveis desse hormônio foram detectados em plantas MT infectadas por *M. pernicioso* aos 10, 20 e 30 DAI (Costa, 2017). Além disso, um estudo da infecção por *B. cinerea* em mutantes *ent3:nsh3* de arabidopsis, deficientes na captação de nucleosídeos extracelulares, induziu o acúmulo de adenosina e uridina no apoplasto folhas infectadas. O acúmulo desses nucleosídeos sinalizou para alterações fisiológicas, como a redução na eficiência do fotossistema II e na expressão genes associados à fotossíntese. Ainda, o acúmulo de adenosina e uridina foi correlacionado à maior susceptibilidade da planta arabidopsis ao patógeno *B. cinerea*, bem como à repressão de genes *PR1* e *WRKY33* (Daumann et al., 2015).

5.3.6 Metabolismo secundário e modificação de parede celular

Em infecções de plantas por patógenos, uma parte do carbono armazenado em sacarose é frequentemente desviada para a produção de compostos fenilpropanoides, kaempferol, quercetina e glucosinolatos. A outra parte, por sua vez, fornece energia necessária para dar suporte à biossíntese aumentada desses metabólitos secundários. Diversos fenilpropanoides apresentam um espectro amplo de atividade antimicrobiana, contribuindo na resposta de defesa de hospedeiros contra patógenos, tanto para a produção de fitoalexinas, isto é, compostos antimicrobianos envolvidos na defesa contra patógenos, quanto para a deposição de lignina para o reforço da parede celular secundária (Miedes et al., 2014). Além disso, foi demonstrado um papel para os compostos fenilpropanoides como moléculas sinalizadoras (Dixon et al., 2002). Um exemplo é a via de fenilpropanoides como precursora do ácido salicílico, hormônio envolvido na ativação de resposta sistêmica adquirida contra patógenos.

No patossistema *Erwinia carotovora* x cenoura foi descrito o aumento na expressão de *PAL* posteriormente ao aumento de invertase de parede celular (Sturm & Chrispeels, 1990). Da mesma maneira, em plantas transgênicas de tabaco silenciadas para a invertase de parede celular, a ativação de *PAL* foi atrasada (Essmann et al., 2008), e o acúmulo de hexoses pode regular a atividade de *PAL* (Tauzin & Giardina, 2014).

Durante a infecção de MT por *M. pernicioso*, aos 20 DAI ocorre a diminuição dos níveis de fenilalanina, corroborando a indução do gene *PHENYLALANINE AMMONIA LYASE (PAL)*, o qual codifica uma enzima responsável pela conversão de fenilalanina a ácido cinâmico. Possivelmente, a via de produção de fenilpropanoides tenha sido ativada em plantas MT em resposta à infecção por *M. pernicioso*, sobretudo para a formação de lignina, uma vez que genes associados à produção de monômeros de lignina, *HYDROXYCINNAMOYLTRANSFERASE* e *CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE 9*, foram induzidos aos 20 DAI.

Em plantas vasculares, a lignina é comumente o componente estrutural mais abundante das paredes celulares secundárias. A lignina é sintetizada através de uma das ramificações da via de fenilpropanoides, fornecendo força mecânica e funcionando como um reforço da parede celular que, entre outras funções, forma uma barreira física durante a penetração do patógeno, na tentativa de limitar sua colonização (Hu et al., 2017). Além de limitar a colonização de patógenos, a deposição de lignina também limita a infiltração de toxinas e enzimas que degradam parede celular mediante à modificação química das subunidades que a constitui, e previne a transferência de água e nutrientes para o patógeno, restringindo assim seu crescimento (Hu et al., 2017). A lignificação e

reforço de parede celular são mecanismos fundamentais à resposta contra infecção por fungos (Naoumkina et al., 2010).

No entanto, os dados de $^1\text{H-RMN}$ revelaram a redução de ácido clorogênico + ferúlico em plantas MT infectadas com *M. pernicioso* em relação as não infectadas. Em folhas de tabaco, foi demonstrado que a enzima PAL controla diretamente a taxa de produção de ácido clorogênico, além de estar envolvida no controle do fluxo de produção de flavonoides e lignina (Howles et al., 1996). Ácidos clorogênicos (CGAs) são formados por meio da combinação de derivativos do ácido cinâmico, como o ácido cafeico, ferúlico ou coumárico, com o ácido quínico (Zhang et al., 2016). Além disso, o gene *CHALCONE SYNTHASE*, que codifica a enzima chave na produção de flavonoides, foi bastante reprimido aos 20 DAI. Os flavonoides são compostos importantes na resistência contra fungos e bactérias, devido a suas propriedades antioxidantes (Treutter, 2006).

Além disso, aos 30 DAI, níveis reduzidos do alcaloide trigonelina foram observados durante a infecção por *M. pernicioso*. Possivelmente, uma estratégia adquirida por *M. pernicioso* seja a manipulação da via dos fenilpropanoides e alcaloides, evitando a formação de ácido clorogênico, alguns flavonoides e trigonelina.

No início da infecção por *M. pernicioso*, aos 4 DAI e 10 DAI, observaram-se baixos níveis de mio-inositol-1-fosfato em plantas infectadas em relação as não infectadas. No entanto, aos 20 DAI, foi observado o aumento nos níveis desse metabólito. Mio-inositol pode gerar compostos como fosfatidilinositol e seus derivados, inositol polifosfatos, galactinol, rafinose, pinitol e polissacarídeos de parede celular. O primeiro produto resultante do catabolismo de mio-inositol é ácido-D-glucurônico, utilizado na formação de compostos pectídicos e não celulósicos de parede celular (Valluru & Van den Ende, 2011). De acordo com isso, aos 10 DAI foram observados baixos níveis de ácido-D-glucurônico, seguido do seu aumento, aos 20 DAI. Além disso, outro produto do catabolismo de mio-inositol é o L-ácido ascórbico (Valluru & Van den Ende, 2011).

O aumento no conteúdo de guloose e ácido glucurônico em plantas MT infectadas por *M. pernicioso* sugere o aumento da via do ácido ascórbico, ou para a via de produção de pectina e hemicelulose, durante a infecção (Loewus & Murthy, 2000). O catabolismo de ácido ascórbico acumula alguns produtos, como os ácidos treônico, tartárico, glicérico e oxálico (Loewus, 1999). Corroborando o acúmulo de ácido treônico em plantas infectadas aos 20 DAI, os dados de RNA-seq indicaram a indução do gene *ASCORBATE OXIDASE*, o qual codifica para uma enzima responsável pela oxidação de ascorbato. A oxidação de ascorbato

está associada à formação de H_2O_2 , com papel na defesa de plantas contra agentes patogênicos e no reforço de parede celular (Kärkönen et al., 2017; Smirnov, 2018).

A infecção por *M. perniciosus* em cacauzeiro pode induzir a formação de cristais de oxalato de cálcio nos tecidos com sintomas, com um papel na regulação da morte celular e formação de H_2O_2 , decorrente da degradação do oxalato pela enzima oxalato oxidase (Ceita et al., 2007; Rio et al 2008). Uma vez que uma das principais fontes de oxalato em plantas é o ascorbato, foi sugerido que a formação dos cristais de oxalato esteja associada à acumulação de ascorbato em tecidos infectados de cacau (Ceita et al., 2007; Rio et al 2008). No entanto, foi demonstrado que *M. perniciosus*, durante a fase biotrófica da infecção nas vassouras-verdes de cacauzeiro, expressa diversos genes que codificam enzimas relacionadas à detoxificação de toxinas, sobrevivendo ao ambiente oxidativo no apoplasto do hospedeiro (Teixeira et al., 2014).

Em MT, a indução de *ASCORBATE OXIDASE* e o acúmulo de ácido treônico sugerem a produção de H_2O_2 como resposta de defesa contra *M. perniciosus*, exibindo um ambiente de estresse oxidativo na região de infecção. No entanto, a necrose do tecido não é observada nessa interação.

Além disso, a superexpressão de PAL em plantas MT infectadas por *M. perniciosus* indicam a indução da via de fenilpropanoides aos 20 DAI. No entanto, foram observados níveis diminuídos de ácido clorogênico+ferúlico e uma possível redução na formação de flavonoides, devido à repressão do gene que codifica para uma chalcone synthase. Aparantemente, a indução da via dos fenilpropanoides está favorecendo a formação de lignina, mas não de ácido clorogênico + ferúlico e flavonoides. Nos tempos 12, 24 e 48 horas após a infecção por *M. perniciosus*, a indução de genes da via de formação de lignina (J. L. Costa, comunicação pessoal, 10 de janeiro de 2018) sugere uma resposta inicial de MT na contenção da invasão do patógeno. A indução de genes associados à formação de lignina aos 20 DAI poderiam atuar na tentativa de contenção da infecção por MT. Por outro lado, como discutido acima, a formação de lignina poderia favorecer o consumo desse composto *M. perniciosus* na fase necrotrófica. A presença de genes que codificam lacases (Teixeira et al., 2014), enzimas associadas à degradação de lignina, em *M. perniciosus* biótipo-C, corrobora essa suposição.

5.4 A infecção por *M. pernicioso* atrasa o desenvolvimento de flores e reduz o número e a biomassa de frutos de MT

Acredita-se que a infecção por patógenos (hemi)biotróficos pode resultar na perda de produtividade de plantas hospedeiras devido à alteração da dinâmica fonte/dreno das plantas e ao alto custo energético nas respostas de defesa (Lemoine et al., 2013). O número reduzido de flores e frutos, e a menor biomassa total de frutos de plantas MT infectadas sugerem que a infecção por *M. pernicioso*, possivelmente, interfira na remobilização de energia na planta hospedeira. A expressão dos genes que codificam uma invertase e transportadores de açúcares, o acúmulo de frutose e poliaminas e translocação de ^{14}C -glicose na região de sintomas de plantas infectadas sugerem a formação de um dreno competitivo, podendo prejudicar o desenvolvimento de outras partes das plantas MT infectadas, como raízes, flores e frutos.

A proteína SFT é um sinal translocável via floema que induz florescimento. A avaliação do número de flores e frutos do mutante *sft*, que apresenta fenótipo de atraso de florescimento (Lifschitz et al., 2006) e a linha transgênica *35S::SFT*, que apresenta precocidade no florescimento (Silva, 2016), demonstrou que a infecção por *M. pernicioso* não afeta a transição do meristema vegetativo para meristema reprodutivo em MT, somente atrasa o desenvolvimento das flores, possivelmente devido ao gasto energético com a formação do dreno competitivo e com as respostas de defesa. Os dados de RNA-seq mostraram que aos 10 DAI, plantas MT infectadas por *M. pernicioso* apresentam repressão de *SFT* e *LATE ELONGATED HYPOCOTYL*. Já aos 20 DAI, outros genes relacionados ao florescimento, como *AGAMOUS*, *CONSTANS*, *SPL* e *APETALA* foram reprimidos (J. L. Costa, comunicação pessoal, 10 de janeiro de 2018).

Curiosamente, a infecção da linha transgênica *35S::SFT* por *M. pernicioso* embora tenha promovido sintomas de engrossamento de caule, não reduziu a biomassa de raiz e frutos em plantas MT. Possivelmente, devido à precocidade de florescimento, o fato de *35S::SFT* ter realizado a transição do meristema vegetativo para reprodutivo bem antes da inoculação com *M. pernicioso* e ter altura reduzida e, considerando-se que essa transição envolve sinalização por açúcar (Roitsch et al., 2003), demonstra que o açúcar disponível já havia sido sinalizado e utilizado como agente trófico para a formação de flores e raízes, antes da formação de dreno forte no caule, não prejudicando portanto a formação desses órgãos.

5.5 Proposta de modelo bioquímico e fisiológico para infecção por *M. pernicioso* em MT

O fungo *M. pernicioso*, quando inoculado na região meristemática, se instala no apoplasto de MT, induzindo notáveis alterações metabólicas e fisiológicas nessas plantas. A indução de citocinina promove a formação de um dreno de nutrientes na região sintomas de engrossamento no caule, por meio da indução de uma invertase de parede celular, juntamente com a indução de transportadores e sinalizadores de açúcares. Aos 20 DAI, os açúcares liberados no apoplasto podem ser consumidos pelo patógeno ou utilizados pelo hospedeiro para: 1) recuperação pela célula para entrar nas vias de glicólise e TCA para produção de energia, 2) expansão e divisão celular do tecido que caracteriza o sintoma de engrossamento (a colonização de regiões meristemáticas possivelmente facilite a manipulação das divisões celulares) e 3) como resposta de defesa de MT para privar *M. pernicioso* de açúcares. Os açúcares podem atuar como sinalizadores, induzindo a perda de dominância apical das plantas e, conseqüentemente, a proliferação aumentada de ramos laterais. Ainda, o acúmulo de açúcares resulta na repressão de genes relacionados à fotossíntese, ao mesmo tempo em que o estresse hídrico nas folhas, devido à diminuição das raízes (possivelmente resultado da alteração do balanço hormonal) de plantas infectadas e translocação de água favorecida para região de engrossamento do caule, induzem o fechamento de estômatos. Como consequência, a taxa fotossintética das folhas é reduzida, reduzindo também a área foliar total e biomassa de folhas de plantas infectadas. Devido à remobilização de açúcares para a região de infecção dos caules, folhas desenvolvidas na altura dessa região apresentam sintomas de clorose e encarquilhamento. Nos caules engrossados de plantas infectadas, a translocação aumentada de água via xilema pode contribuir com a nutrição do patógeno, bem como para a expansão das células do tecido. Nesse sentido, açúcares, poliois e GABA acumulados na região de infecção podem atuar como osmoprotetores. Além disso, em caules de plantas infectadas, regiões que demandam alta energia, são acumulados altos níveis de ácidos orgânicos do ciclo TCA, caracterizando um aumento no metabolismo respiratório das células nessas regiões. O aumento de poliaminas contribui para o retardo de senescência na formação do dreno e, o acúmulo dos aminoácidos glutamato e aspartato pode estar associado à translocação de nitrogênio para tecido dreno das plantas hospedeiras.

Concomitantemente, observa-se a modificação da parede celular da planta hospedeira, tendo em vista o acúmulo de ácido glucurônico e a indução de genes que atuam na modificação da parede celular. Algumas vias foram detectadas como possíveis formadoras de ROS para a sinalização de defesa e para a polimerização da lignina em MT infectado, como pelo aumento da fotorrespiração, e pelas oxidações de prolina, poliaminas e ascorbato.

Ao mesmo tempo, a planta hospedeira também conta com um arsenal de metabólitos que neutralizam ROS, como pela produção de GABA e rafinose, para amenizar o efeito prejudicial ao metabolismo celular da própria planta. Ainda como resposta de defesa, a via dos fenilpropanoides é induzida, considerando-se a ativação de PAL, sobretudo para a formação de lignina. A formação de lignina poderia funcionar como nutriente para *M. perniciosa* na fase necrotrófica. Além disso, a formação de flavonoides e ácido clorogênico é limitada, possivelmente por uma atuação de *M. perniciosa* reduzir a atuação de compostos antimicrobianos ou para favorecer somente a produção de lignina como resposta a esse patógeno. Como consequência da formação de dreno de nutrientes e do gasto energético com as respostas de defesa, a infecção por *M. perniciosa* resulta no atraso do desenvolvimento de flores, bem como na redução da produção de frutos de plantas MT. Aos 30 DAI, a repressão de transportadores de sacarose sugere um impedimento da exportação desse açúcar da região de infecção. No entanto, a indução de transportadores de poliois e monossacarídeos para o vacúolo sugerem uma função como osmoprotetores e na expansão do tecido. Diferentemente da infecção em cacaueteiro, a infecção por *M. perniciosa* em MT não resulta na necrose do tecido, sendo mantido o retardo da senescência nos caules infectados até a morte natural da planta.

5.6 Aplicação açúcar reduz sintomas da infecção por *M. perniciosa* em MT

Sabe-se que a sacarose possui um papel importante na transição da dinâmica fonte/dreno e na sinalização para a expressão de genes relacionados à resposta de defesa contra patógenos em plantas (Moghaddam & Van den Ende, 2012; Morkunas & Ratajczak, 2014). A infecção pelo fungo biotrófico *Ustilago maydis* promove a formação de tumores no milho, alterando a dinâmica fonte/dreno dessas plantas. A injeção de 50 µL de 0,438 M sacarose na região de infecção por *U. maydis* estimulou a virulência do patógeno, resultando no aumento nos sintomas da infecção no caule de milho (Kretschmer et al., 2017).

De modo contrário, a aplicação de 1 M de sacarose em plantas MT infectadas por *M. perniciosa* reduziu o engrossamento do caule, sintoma característico da infecção. Provavelmente, o efeito da sacarose durante a infecção por *M. perniciosa* em MT não tenha favorecido o crescimento do patógeno, como reportado por Kretschmer et al. (2017). O crescimento limitado e em baixas densidades de *M. perniciosa* no apoplasto de seu hospedeiro (Penman et al., 2000; Sena et al., 2014; Deganello et al., 2014) poderia explicar tal resultado.

Curiosamente, a aplicação de sacarose nas plantas MT reduziu a expressão dos genes do metabolismo de sacarose em relação às plantas MT que não receberam sacarose. De modo geral, a aplicação de sacarose em plantas infectadas comparado a plantas não infectadas tratadas com sacarose apresentou o mesmo padrão de expressão de *SUT1*, *TPS1* e *WIV-1* em plantas MT infectadas em relação a não infectadas tratadas com solução *mock*, mas em menor proporção. Esses resultados sugerem que, possivelmente, a redução de sintomas nas plantas infectadas tratadas com sacarose diminua a força do dreno na região da infecção.

Além disso, a redução na expressão de *STP1* e o nível de expressão similar de *TIVI* em plantas MT infectadas tratadas com sacarose em relação a plantas MT não infectadas tratadas com sacarose apresentaram um padrão distinto de expressão desses genes em plantas infectadas tratadas com solução *mock*. Possivelmente, a redução de sintomas esteja associada à redução do transporte de hexoses para o interior da célula por *STP1*, bem como a diminuição do acúmulo de açúcares no vacúolo de células por *TIVI* do órgão dreno (caule).

Alguns estudos sugerem a participação de açúcares, sobretudo a sacarose, na resistência das plantas contra patógenos (Bezruczyk et al., 2018). O papel essencial sacarose como fonte de energia e fornecedora de esqueletos de carbono, bem como molécula sinalizadora, já é bem estabelecido (Roitsch et al., 2003; Bolton, 2009; Trouvelot et al., 2014). Em suspensões celulares de arábida, o tratamento com sacarose e glicose induziu a expressão de diversos genes *PR* e a acumulação de proteínas *PR-2* e *PR-5* dependentes da via de ácido salicílico (Thibaud et al., 2004). Além disso, a aplicação exógena de sacarose e hexoses em eixos de embrião de lupina após a infecção pelo patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lupini* estimulou a indução de PAL, levando ao acúmulo de isoflavonas, metabólitos importantes na defesa contra patógenos, em relação as plantas infectadas sem implementação de sacarose. A sacarose suplementada foi sugerida como fornecedora esqueleto de carbono para a formação de compostos secundários (Morkunas et al., 2005).

Além disso, foi demonstrado que a adição de açúcar ao arroz, levou à resistência à doença brusone (Gómez-Ariza et al., 2007), assim como a aplicação foliar de microdoses de sacarose em orquídeas foi capaz de proteger parcialmente contra a infestação por *Cydia pomonella* em frutos de tomateiro (Arnault et al., 2016). Portanto, outra possível razão para a redução nos sintomas de plantas MT infectadas por *M. perniciosa* após a aplicação diária de sacarose seria o fornecimento aumentado de carbonos de esqueleto para a formação de compostos secundários ou devido à sinalização para resposta de defesa dependente de açúcar.

Uma explicação fisiológica direta para o papel da sacarose na redução dos sintomas seria o fato de os carboidratos serem osmólitos, enquanto que os fungos necessitam de um potencial hídrico ótimo para o seu desenvolvimento (Morkunas et al., 2005). Foi demonstrado que a suplementação de sacarose em baixas concentrações (5-30 g L⁻¹) aumentou biomassa de suspensões de *Prunella vulgaris* L. enquanto que a suplementação com altas concentrações (35-50 g L⁻¹) levou à redução da biomassa, devido ao alto estresse osmótico e desidratação (Zhang et al., 1996). Ainda, o estresse osmótico induzido por sacarose pode resultar na variação de biomassa e produção de metabólitos secundários dependendo das espécies de plantas (Fazal et al., 2016). Além disso, a suplementação com altas concentrações de sacarose, que leva ao alto estresse osmótico, leva à produção de H₂O₂ em culturas de raízes adventícias de *Hypericum perforatum* (Cui et al., 2010).

Foi também proposta uma hipótese de *priming* para o papel de açúcares na resposta de defesa, cuja premissa se baseia na indução de genes de defesa após a detecção de hexoses (Herbes et al., 1996). Mais recentemente, foi demonstrado que a infecção de *Coletrotrichum higginsianum* em *Arabidopsis* causa defeitos no carregamento do floema pode induzir uma resposta de defesa *priming* mediada por AS (Gebauer et al., 2017). Açúcares exógenos podem atuar como moléculas de *priming* promovendo a preparação da planta hospedeira para induzir repostas de defesa mais rapidamente e intensivamente ao ataque de microrganismos (Gómez-Ariza et al., 2007). Nesse trabalho, a redução dos sintomas pode não estar associada à resposta de defesa mais rápida, uma vez que a aplicação de açúcar foi iniciada dois dias após a inoculação com o fungo *M. perniciosa* em MT, mas pode ser resultado de uma resposta de defesa mais intensa.

6 CONCLUSÕES

- ❖ A infecção por *M. perniciosa* induziu os sintomas de engrossamento de caule e pecíolos, clorose na folha adjacente à região de engrossamento do caule, engrossamento de pecíolos nas folhas mais expandidas, próximas à região de sintoma no caule, e engrossamento de pedúnculo floral, redução de raízes, redução na biomassa e área total de folhas e redução do número e biomassa de frutos em plantas MT.
- ❖ *M. perniciosa* promoveu a redução na taxa fotossintética, fechamento de estômatos, redução na transpiração e aumento na concentração intracelular de CO₂ em folhas de plantas MT infectadas. Ainda, o aumento do diâmetro do caule decorrente da infecção por *M. perniciosa* resultou no aumento da condutância e condutividade hidráulica de água na região de infecção.
- ❖ Os metabólitos foram identificados em três tempos após a infecção, 4, 10 e 20 DAI por GC-TOF-MS e 4, 10, 20 e 30 DAI por RMN, demonstrando alterações metabólicas mais notáveis aos 20 DAI. Os dados obtidos foram comparados com a análise transcriptômica da interação *M. perniciosa* x MT em quatro tempos de avaliação, 5, 10, 20 e 30 DAI.
 - Aos 4 DAI, foi observado um aumento nos níveis valina e metionina, bem como a redução de ácido glicólico e mio-inositol-1-fosfato.
 - Aos 10 DAI, foi detectada a diminuição de metabólitos associados à respiração, mas o acúmulo de rafinose. Além disso, nesse período genes relacionados à fotossíntese e síntese de amido foram reprimidos.
 - Aos 20 DAI, o aumento no metabolismo respiratório e a indução de genes de degradação, transporte e sinalização de açúcares demonstrou uma alta demanda de energia e a realocação de carbono, indicando o fornecimento de energia para sustentar a formação de um possível dreno, ou mesmo o crescimento do patógeno. A redução nos níveis de sacarose e o acúmulo de frutose e poliaminas também sustenta essa hipótese. A indução das vias de fenilpropanoides, sobretudo para a síntese de lignina, e da produção de ácido ascórbico, considerando-se o aumento dos metabólitos ácido glucurônico e gulose. A oxidação de prolina, poliaminas e ascorbato exibe um ambiente de estresse oxidativo na região de sintomas das plantas MT. Ao mesmo tempo, o aumento dos compostos rafinose e GABA sugere a neutralização de ROS, amenizando seu efeito prejudicial nas células.
 - Aos 30 DAI, a realocação de carbono e as vias de sinalização de açúcares foram alteradas, com a repressão de genes *SUT1* e *SWEET1* e indução de *TMT* e *PMT*.

A indução de uma asparaginase pode estar associada ao fornecimento de nitrogênio para tecidos dreno e na remobilização de asparagina livre que se acumula em resposta ao estresse ou à deficiência de nutrientes.

- ❖ A infecção por *M. perniciosus* induziu o aumento na translocação de ^{14}C glicose para a região sintomática de MT infectadas. Por sua vez, infecção de linhas transgênicas 35S::*AtCKX2*, com baixos níveis de citocinina, não induziu a translocação de ^{14}C glicose aumentada para a região de infecção. Por outro lado, a aplicação de BA aumentou a translocação de ^{14}C glicose, sugerindo um papel da citocinina na remobilização de ^{14}C glicose em MT, presumidamente à formação de dreno de nutrientes.
- ❖ A aplicação de sacarose em plantas MT infectadas por *M. perniciosus* reduziu os sintomas de engrossamento do caule, mas não os sintomas de redução de raízes ou redução no número de frutos, sendo sugeridos três possíveis motivos:
 - A aplicação de açúcar reduziu a expansão (e divisão) celular do tecido, mediada pelo transporte de açúcar para dentro das células e vacúolos, que estão associados à formação dos sintomas de engrossamento do caule.
 - A aplicação exógena de sacarose promoveu o fornecimento aumentado de carbonos de esqueleto para a formação de compostos secundários ou à sinalização para resposta de defesa dependente de açúcar.
 - Altas concentrações de sacarose causaram um estresse osmótico em caules de plantas MT.
- ❖ A infecção por *M. perniciosus* no mutante com fenótipo de atraso de florescimento, *sft*, e na linha transgênica com precocidade de florescimento, 35S::*SFT*, demonstrou que a infecção por *M. perniciosus* não afeta a transição do meristema vegetativo para meristema reprodutivo em MT, somente atrasa o desenvolvimento das flores.
- ❖ A infecção por *M. perniciosus* nos mutantes *lutescent* e *green flesh*, associados à precocidade e retardamento de senescência, respectivamente, não alteraram os sintomas da infecção, nem permitiram a observação de necrose do tecido infectado em MT, como ocorre em cacauero infectado por esse patógeno.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Farid, I. B., Jahangir, M., van den Hondel, C. A. M. J. J., Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2009). Fungal infection-induced metabolites in *Brassica rapa*. *Plant Science*, *176*(5), 608-615.
- Acharya, B. R., & Assmann, S. M. (2009). Hormone interactions in stomatal function. *Plant Molecular Biology*, *69*(4), 451-462.
- Aime, M. C., & Phillips-Mora, W. (2005). The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (*Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, *97*(5), 1012-1022.
- Akhtar, M. S., Goldschmidt, E. E., John, I., Rodoni, S., Matile, P., & Grierson, D. (1999). Altered patterns of senescence and ripening in gf, a stay-green mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Experimental Botany*, *50*(336), 1115-1122.
- Aldesuquy, H. S., Abdel-Fattah, G. M., & Baka, Z. A. (2000). Changes in chlorophyll, polyamines and chloroplast ultrastructure of *Puccinia striiformis* induced 'green islands' on detached leaves of *Triticum aestivum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *38*(7-8), 613-620.
- Allwood, J. W., Ellis, D. I., & Goodacre, R. (2008). Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant-host interactions. *Physiologia Plantarum*, *132*(2), 117-135.
- Aloni, R., Pradel, K. S., & Ullrich, C. I. (1995). The three-dimensional structure of vascular tissues in *Agrobacterium tumefaciens*-induced crown galls and in the host stems of *Ricinus communis* L. *Planta*, *196*(3), 597-605.
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., & Ullrich, C. I. (2006). Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany*, *97*(5), 883-893.
- Adebrhan, T., Figueira, A., Yamada, M. M., Cascardo, J., & Furtek, D. B. (1999). Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicios*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, *105*(2), 167-175.
- Aneja, M., & Gianfagna, T. (2001). Induction and accumulation of caffeine in young, actively growing leaves of cocoa (*Theobroma cacao* L.) by wounding or infection with *Crinipellis pernicios*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *59*(1), 13-16.
- Apparecido, R. P., Carlos, E. F., Lião, L. M., Vieira, L. G. E., & Alcantara, G. B. (2017). NMR-based metabolomics of transgenic and non-transgenic sweet orange reveals different responses in primary metabolism during citrus canker development. *Metabolomics*, *13*(2), 20.

- Araujo, L., Bispo, W. M. S., Cacique, I. S., Moreira, W. R., & Rodrigues, F. Á. (2014). Resistance in mango against infection by *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology*, *104*(8), 820-833.
- Arnault, I., Lombarkia, N., Joy-Ondet, S., Romet, L., Brahim, I., Meradi, R., ... & Derridj, S. (2016). Foliar application of microdoses of sucrose to reduce codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) damage to apple trees. *Pest Management Science*, *72*(10), 1901-1909.
- Aung, K., Jiang, Y., & He, S. Y. (2018). The role of water in plant–microbe interactions. *The Plant Journal*, *93*(4), 771-780.
- Barau, J., Grandis, A., Carvalho, V. M. D. A., Teixeira, G. S., Zapparoli, G. H. A., do Rio, M. C. S., ... & Pereira, G. A. G. (2014). Apoplastic and intracellular plant sugars regulate developmental transitions in witches' broom disease of cacao. *Journal of Experimental Botany*, *66*(5), 1325-1337.
- Barry, C. S., Aldridge, G. M., Herzog, G., Ma, Q., McQuinn, R. P., Hirschberg, J., & Giovannoni, J. J. (2012). Altered chloroplast development and delayed fruit ripening caused by mutations in a zinc metalloprotease at the lutescent2 locus of tomato. *Plant Physiology*, *159*(3), 1086-1098.
- Bastos, C. N., & Evans, H. C. (1985). A new pathotype of *Crinipellis pernicios*a (witches' broom disease) on solanaceous hosts. *Plant Pathology*, *34*(2), 306-312.
- Berger, S., Papadopoulos, M., Schreiber, U., Kaiser, W., & Roitsch, T. (2004). Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum*, *122*(4), 419-428.
- Berger, S., Sinha, A. K., & Roitsch, T. (2007). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*, *58*(15-16), 4019-4026.
- Berryman, C. A., Eamus, D., & Farrar, J. F. (1991). Water relations of leaves of barley infected with brown rust. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *38*(6), 393-405.
- Bezruczyk, M., Yang, J., Eom, J. S., Prior, M., Sosso, D., Hartwig, T., ... & Yang, B. (2018). Sugar flux and signaling in plant–microbe interactions. *The Plant Journal*, *93*(4), 675-685.
- Bolton, M. D. (2009). Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *22*(5), 487-497.
- Bonfig, K. B., Schreiber, U., Gabler, A., Roitsch, T., & Berger, S. (2006). Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta*, *225*(1), 1-12.

- Brandt, B., Brodsky, D. E., Xue, S., Negi, J., Iba, K., Kangasjärvi, J., ... & Schroeder, J. I. (2012). Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 109(26), 10593-10598.
- Carvalho, R. F., Campos, M. L., Pino, L. E., Crestana, S. L., Zsögön, A., Lima, J. E., ... & Peres, L. E. (2011). Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods*, 7(1), 18.
- Cecchini, N. M., Monteoliva, M. I., & Alvarez, M. E. (2011). Proline dehydrogenase contributes to pathogen defense in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 155(4), 1947-1959.
- Ceita, G. O., Macêdo, J. N. A., Santos, T. B., Alemanno, L., da Silva Gesteira, A., Micheli, F., ... & Mazzafera, P. (2007). Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in Theobroma cacao tissues triggered by the hemibiotrophic fungus Moniliophthora perniciosa. *Plant Science*, 173(2), 106-117.
- Chandran, D., Inada, N., Hather, G., Kleindt, C. K., & Wildermuth, M. C. (2010). Laser microdissection of Arabidopsis cells at the powdery mildew infection site reveals site-specific processes and regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 107(1), 460-465.
- Chaves, F. C., & Gianfagna, T. J. (2006). Necrotrophic phase of Moniliophthora perniciosa causes salicylic acid accumulation in infected stems of cacao. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69(1-3), 104-108.
- Chen, L. Q., Hou, B. H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X. Q., ... & Chermak, D. (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, 468(7323), 527.
- Cheng, S. H., & Kao, C. H. (1983). Localized effect of polyamines on chlorophyll loss. *Plant and Cell Physiology*, 24(8), 1463-1467.
- Cho, J. I., Ryoo, N., Eom, J. S., Lee, D. W., Kim, H. B., Jeong, S. W., ... & Hahn, T. R. (2009). Role of the rice hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as glucose sensors. *Plant Physiology*, 149(2), 745-759.
- Chong, J., Piron, M. C., Meyer, S., Merdinoglu, D., Bertsch, C., & Mestre, P. (2014). The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with Botrytis cinerea. *Journal of Experimental Botany*, 65(22), 6589-6601.
- Coghlan, S. E., & Walters, D. R. (1990). Polyamine metabolism in 'green-islands' on powdery mildew-infected barley leaves: possible interactions with senescence. *New Phytologist*, 116(3), 417-424.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R., & Tavladoraki, P. (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science*, 11(2), 80-88.

- Coruzzi, G. M. (2003). Primary N-assimilation into amino acids in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*, e0010. doi: 10.1199/tab.0010.
- Costa, J. L. (2017). *Patogenicidade e regulação hormonal na interação Moniliophthora perniciosa x Solanum lycopersicum*. (Tese de doutorado, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo). Recuperado de www.teses.usp.br.
- Cowley, T., & Walters, D. R. (2002). Polyamine metabolism in barley reacting hypersensitively to the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Plant, Cell & Environment*, 25(3), 461-468.
- Cox, K. L., Meng, F., Wilkins, K. E., Li, F., Wang, P., Booher, N. J., ... & Zheng, Y. (2017). TAL effector driven induction of a SWEET gene confers susceptibility to bacterial blight of cotton. *Nature Communications*, 8, 15588.
- Cuadros-Inostroza, Á., Caldana, C., Redestig, H., Kusano, M., Lisec, J., Peña-Cortés, H., ... & Hannah, M. A. (2009). TargetSearch-a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 428.
- Cui, X. H., Murthy, H. N., Wu, C. H., & Paek, K. Y. (2010). Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103(1), 7-14.
- Curtis, T. Y., Bo, V., Tucker, A., & Halford, N. G. (2018). Construction of a network describing asparagine metabolism in plants and its application to the identification of genes affecting asparagine metabolism in wheat under drought and nutritional stress. *Food and Energy Security*, 7(1), e00126.
- Dai, N., Schaffer, A., Petreikov, M., Shahak, Y., Giller, Y., Ratner, K., ... & Granot, D. (1999). Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *The Plant Cell*, 11(7), 1253-1266.
- Daumann, M., Fischer, M., Niopek-Witz, S., Girke, C., & Möhlmann, T. (2015). Apoplastic Nucleoside Accumulation in Arabidopsis Leads to Reduced Photosynthetic Performance and Increased Susceptibility Against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1158.
- Deganello, J., Leal, G. A., Rossi, M. L., Peres, L. E. P., & Figueira, A. (2014). Interaction of *Moniliophthora perniciosa* biotypes with Micro-Tom tomato: a model system to investigate the witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Plant Pathology*, 63(6), 1251-1263.
- Devos, S., Laukens, K., Deckers, P., Van Der Straeten, D., Beeckman, T., Inzé, D., ... & Prinsen, E. (2006). A hormone and proteome approach to picturing the initial metabolic events during *Plasmodiophora brassicae* infection on Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(12), 1431-1443.
- Dhandapani, P., Song, J., Novak, O., & Jameson, P. E. (2017). Infection by *Rhodococcus fascians* maintains cotyledons as a sink tissue for the pathogen. *Annals of Botany*, 119(5), 841-852.

- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S., & Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*, 3(5), 371-390.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R. J., Voll, L. M., Usadel, B., Poree, F., ... & Kämper, J. (2008). Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *The Plant Journal*, 56(2), 181-195.
- Dolzblasz, A., Banasiak, A., & Vereecke, D. (2018). Neovascularization during leafy gall formation on *Arabidopsis thaliana* upon *Rhodococcus fascians* infection. *Planta*, 247(1), 215-228.
- Dominov, J. A., Stenzler, L., Lee, S., Schwarz, J. J., Leisner, S., & Howell, S. H. (1992). Cytokinins and auxins control the expression of a gene in *Nicotiana plumbaginifolia* cells by feedback regulation. *The Plant Cell*, 4(4), 451-461.
- Dulermo, T., Rasclé, C., Chinnici, G., Gout, E., Bligny, R., & Cotton, P. (2009). Dynamic carbon transfer during pathogenesis of sunflower by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*: from plant hexoses to mannitol. *New Phytologist*, 183(4), 1149-1162.
- Eastmond, P. J., & Graham, I. A. (2003). Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate?. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 231-235.
- Eckardt, N. A. (2003). A new classic of cytokinin research: cytokinin-deficient *Arabidopsis* plants provide new insights into cytokinin biology. *Plant Biology*, 15, 2489-2492.
- Essmann, J., Schmitz-Thom, I., Schön, H., Sonnewald, S., Weis, E., & Scharte, J. (2008). RNA interference-mediated repression of cell wall invertase impairs defense in source leaves of tobacco. *Plant Physiology*, 147(3), 1288-1299.
- Evans, H. C. (1980). Pleomorphism in *Crinipellis pernicios*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. *Transactions of the British Mycological Society*, 74(3), 515-523.
- Evans, J. L., & Scholes, J. D. (1995). How does clubroot alter the regulation of carbon metabolism in its host? *Aspects of Applied Biology*, (42), 125-132.
- Fabro, G., Kovács, I., Pavet, V., Szabados, L., & Alvarez, M. E. (2004). Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(4), 343-350.
- Fagard, M., Launay, A., Clément, G., Courtial, J., Dellagi, A., Farjad, M., ... & Masclaux-Daubresse, C. (2014). Nitrogen metabolism meets phytopathology. *Journal of Experimental Botany*, 65(19), 5643-5656.
- FAO. <http://www.fao.org/>.
- Figueira, A. & Alemanno, L. *Theobroma cacao cacao*. (2005). In R. E. Litz, *Biotechnology of fruit and nut crops* (639-666). Wallingford, UK: CAB International.

- Fazal, H., Abbasi, B. H., Ahmad, N., Ali, M., & Ali, S. (2016). Sucrose induced osmotic stress and photoperiod regimes enhanced the biomass and production of antioxidant secondary metabolites in shake-flask suspension cultures of *Prunella vulgaris* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 124(3), 573-581.
- Fernie, A. R., Carrari, F., & Sweetlove, L. J. (2004). Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), 254-261.
- Fiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., Altmann, T., Trethewey, R. N., & Willmitzer, L. (2000). Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology*, 18(11), 1157.
- Foyer, C. H., & Shigeoka, S. (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, 155(1), 93-100.
- Frias Treviño, G. A., Purdy, L. H., & Schmidt, R. A. (1991). Infection biology of *Crinipellis pernicios*a on vegetative flushes of cacao. *Plant Disease* 75(6), 552-556.
- Fu, J., Liu, H., Li, Y., Yu, H., Li, X., Xiao, J., & Wang, S. (2011). Manipulating broad-spectrum disease resistance by suppressing pathogen-induced auxin accumulation in rice. *Plant physiology*, 155(1), 589-602.
- Funck, D., Eckard, S., & Müller, G. (2010). Non-redundant functions of two proline dehydrogenase isoforms in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 10(1), 70.
- Garcia, O., Macedo, J. A., Tibúrcio, R., Zaparoli, G., Rincones, J., Bittencourt, L. M., ... & Schiavinato, M. A. (2007). Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora pernicios*a, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. *Mycological Research*, 111(4), 443-455.
- Gear, M. L., McPhillips, M. L., Patrick, J. W., & McCurdy, D. W. (2000). Hexose transporters of tomato: molecular cloning, expression analysis and functional characterization. *Plant Molecular Biology*, 44(5), 687-697.
- Gebauer, P., Korn, M., Engelsdorf, T., Sonnewald, U., Koch, C., & Voll, L. M. (2017). Sugar Accumulation in Leaves of *Arabidopsis* sweet11/sweet12 Double Mutants Enhances Priming of the Salicylic Acid-Mediated Defense Response. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1378.
- Giavalisco, P., Li, Y., Matthes, A., Eckhardt, A., Hubberten, H. M., Hesse, H., ... & Willmitzer, L. (2011). Elemental formula annotation of polar and lipophilic metabolites using ¹³C, ¹⁵N and ³⁴S isotope labelling, in combination with high-resolution mass spectrometry. *The Plant Journal*, 68(2), 364-376
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205-227.

- Gómez-Ariza, J., Campo, S., Rufat, M., Estopà, M., Messeguer, J., Segundo, B. S., & Coca, M. (2007). Sucrose-mediated priming of plant defense responses and broad-spectrum disease resistance by overexpression of the maize pathogenesis-related PRms protein in rice plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *20*(7), 832-842.
- Gordon, S. P., Chickarmane, V. S., Ohno, C., & Meyerowitz, E. M. (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, *106*(38), 16529-16534.
- Griffith, G. W., & Hedger, J. N. (1994). The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicios*a. *Heredity*, *72*(3), 278.
- Griffith, G. W., Nicholson, J., Nenninger, A., Birch, R. N., & Hedger, J. N. (2003). Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *New Zealand Journal of Botany*, *41*(3), 423-435.
- Grondin, A., Rodrigues, O., Verdoucq, L., Merlot, S., Leonhardt, N., & Maurel, C. (2015). Aquaporins contribute to ABA-triggered stomatal closure through OST1-mediated phosphorylation. *The Plant Cell*, *27*(7), 1945-1954.
- Hammond-Kosack, K. E., & Jones, J. D. (1997). Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Biology*, *48*(1), 575-607.
- Herbers, K., Meuwly, P., Métraux, J. P., & Sonnewald, U. (1996). Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related protein transcripts by sugars is dependent on leaf developmental stage. *Febs Letters*, *397*(2-3), 239-244.
- Heuberger, A. L., Robison, F. M., Lyons, S. M. A., Broeckling, C. D., & Prenni, J. E. (2014). Evaluating plant immunity using mass spectrometry-based metabolomics workflows. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 291.
- Hofmann, J., El Ashry, A. E. N., Anwar, S., Erban, A., Kopka, J., & Grundler, F. (2010). Metabolic profiling reveals local and systemic responses of host plants to nematode parasitism. *The Plant Journal*, *62*(6), 1058-1071.
- Howles, P. A., Sewalt, V. J., Paiva, N. L., Elkind, Y., Bate, N. J., Lamb, C., & Dixon, R. A. (1996). Overexpression of L-phenylalanine ammonia-lyase in transgenic tobacco plants reveals control points for flux into phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiology*, *112*(4), 1617-1624.
- Hu, Y., Zhang, J., Jia, H., Sosso, D., Li, T., Frommer, W. B., ... & Jones, J. B. (2014). Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, *111*(4), E521-E529.
- Hu, Q., Min, L., Yang, X., Jin, S., Zhang, L., Li, Y., ... & Lindsey, K. (2017). Laccase GhLac1 modulates broad-spectrum biotic stress tolerance via DAMP-triggered immunity. *Plant Physiology*, *176*, 1808-1873.

- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., & He, S. Y. (2014). Growth–defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant*, 7(8), 1267-1287.
- Ioio, R. D., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M. T., ... & Sabatini, S. (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, 322(5906), 1380-1384.
- Jameson, P. E. (2000). Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions—An overview. *Plant Growth Regulation*, 32(2-3), 369-380.
- Jen, J. J. (1974). Carotenoids of yellow and red lutescent tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22(5), 908-910
- Joosten, M. H., Hendrickx, L. J., & De Wit, P. J. (1990). Carbohydrate composition of apoplastic fluids isolated from tomato leaves inoculated with virulent or avirulent races of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 96(2), 103-112.
- Jorge, T. F., Rodrigues, J. A., Caldana, C., Schmidt, R., van Dongen, J. T., Thomas-Oates, J., & António, C. (2016). Mass spectrometry-based plant metabolomics: Metabolite responses to abiotic stress. *Mass Spectrometry Reviews*, 35, 620-649.
- Julius, B. T., Leach, K. A., Tran, T. M., Mertz, R. A., & Braun, D. M. (2017). Sugar transporters in plants: new insights and discoveries. *Plant and Cell Physiology*, 58(9), 1442-1460.
- Kangasjärvi, S., Neukermans, J., Li, S., Aro, E. M., & Noctor, G. (2012). Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1619-1636.
- Kärkönen, A., Dewhirst, R. A., Mackay, C. L., & Fry, S. C. (2017). Metabolites of 2, 3-diketogulonate delay peroxidase action and induce non-enzymic H₂O₂ generation: Potential roles in the plant cell wall. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 620, 12-22
- Kelly, G., Sade, N., Doron-Faigenboim, A., Lerner, S., Shatil-Cohen, A., Yeselson, Y., ... & Granot, D. (2017). Sugar and hexokinase suppress expression of PIP aquaporins and reduce leaf hydraulics that preserves leaf water potential. *The Plant Journal*.
- Kilaru, A., Bailey, B. A., & Hasenstein, K. H. (2007). *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. *FEMS Microbiology Letters*, 274(2), 238-244.
- Kim, M., Lim, J. H., Ahn, C. S., Park, K., Kim, G. T., Kim, W. T., & Pai, H. S. (2006). Mitochondria-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell*, 18(9), 2341-2355.
- Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, 5(3), 536.

- Kirma, M., Araújo, W. L., Fernie, A. R., & Galili, G. (2012). The multifaceted role of aspartate-family amino acids in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 63(14), 4995-5001.
- Kochevenko, A., Araújo, W. L., Maloney, G. S., Tieman, D. M., Do, P. T., Taylor, M. G., ... & Fernie, A. R. (2012). Catabolism of branched chain amino acids supports respiration but not volatile synthesis in tomato fruits. *Molecular Plant*, 5(2), 366-375.
- Kramer, P. J. (1983). Problems in water relations of plants and cells. *International Review of Cytology*, 85, 253-286.
- Kramer, P. J. (1988). Changing concepts regarding plant water relations. *Plant, Cell & Environment*, 11(7), 565-568
- Krapp, A., Hofmann, B., Schäfer, C., & Stitt, M. (1993). Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink regulation' of photosynthesis?. *The Plant Journal*, 3(6), 817-828.
- Kretschmer, M., Croll, D., & Kronstad, J. W. (2017). Maize susceptibility to *Ustilago maydis* is influenced by genetic and chemical perturbation of carbohydrate allocation. *Molecular Plant Pathology*, 18(9), 1222-1237.
- Kuhn, H., Kwaaitaal, M., Kusch, S., Acevedo-Garcia, J., Wu, H., & Panstruga, R. (2016). Biotrophy at its best: novel findings and unsolved mysteries of the *Arabidopsis*-powdery mildew pathosystem. *The Arabidopsis Book*, e0184. doi: 10.1199/tab.0184.
- Kuiper, D. (1993). Sink strength: established and regulated by plant growth regulators. *Plant, Cell & Environment*, 16(9), 1025-1026.
- Lara, M. E. B., Garcia, M. C. G., Fatima, T., Ehneß, R., Lee, T. K., Proels, R., ... & Roitsch, T. (2004). Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *The Plant Cell*, 16(5), 1276-1287.
- Lea, P. J., Sodek, L., Parry, M. A., Shewry, P. R., & Halford, N. G. (2007). Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology*, 150(1), 1-26.
- Leal, G. A., Albuquerque, P. S., & Figueira, A. (2007). Genes differentially expressed in *Theobroma cacao* associated with resistance to witches' broom disease caused by *Crinipellis perniciosus*. *Molecular Plant Pathology*, 8(3), 279-292.
- Lecompte, F., Nicot, P. C., Ripoll, J., Abro, M. A., Raimbault, A. K., Lopez-Lauri, F., & Bertin, N. (2017). Reduced susceptibility of tomato stem to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* is associated with a specific adjustment of fructose content in the host sugar pool. *Annals of Botany*, 119(5), 931-943.
- Lee, D. K., Ahn, S., Cho, H. Y., Yun, H. Y., Park, J. H., Lim, J., ... & Kwon, S. W. (2016). Metabolic response induced by parasitic plant-fungus interactions hinder amino sugar and nucleotide sugar metabolism in the host. *Scientific Reports*, 6, 37434.

- Lemonnier, P., Gaillard, C., Veillet, F., Verbeke, J., Lemoine, R., Coutos-Thévenot, P., & La Camera, S. (2014). Expression of Arabidopsis sugar transport protein STP13 differentially affects glucose transport activity and basal resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Molecular Biology*, 85(4-5), 473-484.
- Less, H., Angelovici, R., Tzin, V., & Galili, G. (2011). Coordinated gene networks regulating Arabidopsis plant metabolism in response to various stresses and nutritional cues. *The Plant Cell*, 23(4), 1264-1271.
- Lifschitz, E., Eviatar, T., Rozman, A., Shalit, A., Goldshmidt, A., Amsellem, Z., ... & Eshed, Y. (2006). The tomato FT ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 103(16), 6398-6403.
- Litholdo, C. G., Leal, G. A., Albuquerque, P. S., & Figueira, A. (2015). Differential expression of jasmonate biosynthesis genes in cacao genotypes contrasting for resistance against *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Cell Reports*, 34(10), 1747-1759.
- Loewus, F. A. (1999). Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochemistry*, 52(2), 193-210.
- Loewus, F. A., & Murthy, P. P. (2000). myo-Inositol metabolism in plants. *Plant Science*, 150(1), 1-19.
- Lopez-Gresa, M. P., Maltese, F., Bellés, J. M., Conejero, V., Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). Metabolic response of tomato leaves upon different plant-pathogen interactions. *Phytochemical Analysis*, 21(1), 89-94.
- Lopez-Gresa, M. P., Torres, C., Campos, L., Lisón, P., Rodrigo, I., Bellés, J. M., & Conejero, V. (2011). Identification of defence metabolites in tomato plants infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Environmental and Experimental Botany*, 74, 216-228.
- López-Gresa, M. P., Lisón, P., Kim, H. K., Choi, Y. H., Verpoorte, R., Rodrigo, I., ... & Bellés, J. M. (2012). Metabolic fingerprinting of tomato mosaic virus infected *Solanum lycopersicum*. *Journal of Plant Physiology*, 169(16), 1586-1596.
- Ludwig-Müller, J. (2015). Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: balance between development and defense. *Journal of Plant Physiology*, 172, 4-12.
- Ma, K. W., & Ma, W. (2016). Phytohormone pathways as targets of pathogens to facilitate infection. *Plant Molecular Biology*, 91(6), 713-725.
- Mae, T., & Hoshino, T. (1985). Proteinase activities and loss of nitrogen in the senescing leaves of field-grown rice (*Oryza sativa* L.). *Soil Science and Plant Nutrition*, 31(4), 589-600.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., ... & Dietrich, R. A. (2000). The transcriptome of Arabidopsis thaliana during systemic acquired resistance. *Nature Genetics*, 26(4), 403.

- Malinowski, R., Novák, O., Borhan, M. H., Spíchal, L., Strnad, M., & Rolfe, S. A. (2016). The role of cytokinins in clubroot disease. *European Journal of Plant Pathology*, *145*(3), 543-557.
- Marelli, J. P., Maximova, S. N., Gramacho, K. P., Kang, S., & Guiltinan, M. J. (2009). Infection biology of *Moniliophthora perniciosa* on *Theobroma cacao* and alternate solanaceous hosts. *Tropical Plant Biology*, *2*(3-4), 149-160.
- Meinhardt, L. W., Bellato, C. D. M., Rincones, J., Azevedo, R. A., Cascardo, J. C., & Pereira, G. A. (2006). In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Current Microbiology*, *52*(3), 191-196.
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., ... & Levy, A. (1997). A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal*, *12*(6), 1465-1472.
- Melnick, R. L., Marelli, J. P., Sicher, R. C., Strem, M. D., & Bailey, B. A. (2012). The interaction of *Theobroma cacao* and *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease, during parthenocarp. *Tree Genetics & Genomes*, *8*(6), 1261-1279.
- Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W., & Molina, A. (2014). The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 358.
- Mirnezhad, M., Romero-González, R. R., Leiss, K. A., Choi, Y. H., Verpoorte, R., & Klinkhamer, P. G. (2010). Metabolomic analysis of host plant resistance to thrips in wild and cultivated tomatoes. *Phytochemical Analysis*, *21*(1), 110-117.
- Moghaddam B., M. R., & Van den Ende, W. (2012). Sugars and plant innate immunity. *Journal of Experimental Botany*, *63*(11), 3989-3998.
- Molinero-Rosales, N., Latorre, A., JAMILENA, M., & Lozano, R. (2004). SINGLE FLOWER TRUSS regulates the transition and maintenance of flowering in tomato. *Planta*, *218*(3), 427-434.
- Mondego, J. M., Carazzolle, M. F., Costa, G. G., Formighieri, E. F., Parizzi, L. P., Rincones, J., ... & Vidal, R. O. (2008). A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. *BMC Genomics*, *9*(1), 548.
- Monteoliva, M. I., Rizzi, Y. S., Cecchini, N. M., Hajirezaei, M. R., & Alvarez, M. E. (2014). Context of action of proline dehydrogenase (ProDH) in the hypersensitive response of *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, *14*(1), 21.
- Montilla-Bascón, G., Rubiales, D., Altabella, T., & Prats, E. (2016). Free polyamine and polyamine regulation during pre-penetration and penetration resistance events in oat against crown rust (*Puccinia coronata* f. sp. *avenae*). *Plant Pathology*, *65*(3), 392-401.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W. H., Liu, Y. X., ... & Sheen, J. (2003). Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, *300*(5617), 332-336.

- Morkunas, I., Marczak, Ł., Stachowiak, J., & Stobiecki, M. (2005). Sucrose-induced lupine defense against *Fusarium oxysporum*: Sucrose-stimulated accumulation of isoflavonoids as a defense response of lupine to *Fusarium oxysporum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *43*(4), 363-373.
- Morkunas, I., & Ratajczak, L. (2014). The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum*, *36*(7), 1607-1619.
- Moshelion, M., Halperin, O., Wallach, R., Oren, R. A. M., & Way, D. A. (2015). Role of aquaporins in determining transpiration and photosynthesis in water-stressed plants: crop water-use efficiency, growth and yield. *Plant, Cell & Environment*, *38*(9), 1785-1793
- Naoumkina, M. A., Zhao, Q., Gallego-Giraldo, L. I. N. A., Dai, X., Zhao, P. X., & Dixon, R. A. (2010). Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. *Molecular Plant Pathology*, *11*(6), 829-846.
- Obata, T., & Fernie, A. R. (2012). The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *69*(19), 3225-3243.
- Oliveira, B. V., Teixeira, G. S., Reis, O., Barau, J. G., Teixeira, P. J. P., do Rio, M. C. S., ... & Pereira, G. A. (2012). A potential role for an extracellular methanol oxidase secreted by *Moniliophthora perniciosa* in Witches' broom disease in cacao. *Fungal Genetics and Biology*, *49*(11), 922-932.
- Orchard, J. E., & Hardwick, K. (1988). Actas Photosynthesis, carbohydrate translocation and metabolism of host and fungal tissues in cacao seedlings infected with *Crinipellis perniciosa* [Proceedings]. Paper presented at the *10th International Cocoa Research Conference* (No. 633.74063 I61p). Santo Domingo, R. Dominicana.
- Orchard, J., Collin, H. A., Hardwick, K., & Isaac, S. (1994). Changes in morphology and measurement of cytokinin levels during the development of witches' brooms on cocoa. *Plant Pathology*, *43*(1), 65-72.
- Penman, D., Britton, G., Hardwick, K., Collin, H. A., & Isaac, S. (2000). Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Mycological Research*, *104*(6), 671-675.
- Pino, L. E., Lombardi-Crestana, S., Azevedo, M. S., Scotton, D. C., Borgo, L., Quecini, V., ... & Peres, L. E. (2010). The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato 'Micro-Tom' model system. *Plant Methods*, *6*(1), 23.
- Pungartnik, C., Melo, S. C. O., Basso, T. S., Macena, W. G., Cascardo, J. C. M., & Brendel, M. (2009). Reactive oxygen species and autophagy play a role in survival and differentiation of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Fungal Genetics and Biology*, *46*(6-7), 461-472.
- Purdy, L. H., & Schmidt, R. A. (1996). Status of cacao witches' broom: Biology, epidemiology, and management. *Annual Review of Phytopathology*, *34*(1), 573-594.

- Reis, K. L. (2013). *Desenvolvimento de um método para estimativa da condutância hidráulica e avaliação da atividade de aquaporinas em plântulas de milho*. Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo).
- Rincones, J., Scarpari, L. M., Carazzolle, M. F., Mondego, J. M., Formighieri, E. F., Barau, J. G., ... & de Oliveira, B. V. (2008). Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the witches' broom pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *21*(7), 891-908.
- Rio, M. C. S., de Oliveira, B. V., de Tomazella, D. P., Da Silva, J. A. F., & Pereira, G. A. (2008). Production of calcium oxalate crystals by the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao. *Current Microbiology*, *56*(4), 363.
- Rizzi, Y. S., Cecchini, N. M., Fabro, G., & Alvarez, M. E. (2017). Differential control and function of Arabidopsis ProDH1 and ProDH2 genes on infection with biotrophic and necrotrophic pathogens. *Molecular Plant Pathology*, *18*(8), 1164-1174.
- Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R., & Jones, J. D. (2007). Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology*, *10*(4), 372-379.
- Roberts, J. K. (2000). NMR adventures in the metabolic labyrinth within plants. *Trends in Plant Science*, *5*(1), 30-34.
- Robinette, D. A. V. I. D., & Matthyse, A. G. (1990). Inhibition by *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas savastanoi* of development of the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Journal of Bacteriology*, *172*(10), 5742-5749.
- Rodrigues, O., Reshetnyak, G., Grondin, A., Saijo, Y., Leonhardt, N., Maurel, C., & Verdoucq, L. (2017). Aquaporins facilitate hydrogen peroxide entry into guard cells to mediate ABA- and pathogen-triggered stomatal closure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, *114*(34), 9200-9205.
- Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R. N., & Willmitzer, L. (2000). Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *The Plant Journal*, *23*(1), 131-142.
- Roitsch, T., Bittner, M., & Godt, D. E. (1995). Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiology*, *108*(1), 285-294.
- Roitsch, T., Balibrea, M. E., Hofmann, M., Proels, R., & Sinha, A. K. (2003). Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany*, *54*(382), 513-524.
- Rojas, C. M., Senthil-Kumar, M., Tzin, V., & Mysore, K. (2014). Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 17.

- Roman, H., Girault, T., Barbier, F., Péron, T., Brouard, N., Pěňčík, A., ... & Le Gourrierec, J. (2016). Cytokinins are initial targets of light in the control of bud outgrowth. *Plant Physiology*, *172*(1), 489-509.
- Rovenich, H., Boshoven, J. C., & Thomma, B. P. (2014). Filamentous pathogen effector functions: of pathogens, hosts and microbiomes. *Current Opinion in Plant Biology*, *20*, 96-103.
- Samach, A., & Lotan, H. (2007). The transition to flowering in tomato. *Plant Biotechnology*, *24*(1), 71-82.
- Scarpari, L. M., Meinhardt, L. W., Mazzafera, P., Pomella, A. W. V., Schiavinato, M. A., Cascardo, J. C. M., & Pereira, G. A. G. (2005). Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. *Journal of Experimental Botany*, *56*(413), 865-877.
- Schaker, P. D., Peters, L. P., Cataldi, T. R., Labate, C. A., Caldana, C., & Monteiro-Vitorello, C. B. (2017). Metabolome Dynamics of Smutted Sugarcane Reveals Mechanisms Involved in Disease Progression and Whip Emission. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 882.
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., & Gallitelli, D. (2004). Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, *110*(9), 893-908.
- Scholes, J. D., Lee, P. J., Horton, P., & Lewis, D. H. (1994). Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytologist*, *126*(2), 213-222.
- Schultz, J. C., Appel, H. M., Ferrieri, A., & Arnold, T. M. (2013). Flexible resource allocation during plant defense responses. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 324.
- Schulze-Lefert, P., & Panstruga, R. (2003). Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, *41*(1), 641-667.
- Schwartz, A. R., Morbitzer, R., Lahaye, T., & Staskawicz, B. J. (2017). TALE-induced bHLH transcription factors that activate a pectate lyase contribute to water soaking in bacterial spot of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, *114*(5), E897-E903.
- Scotton, D. C., Azevedo, M. D. S., Sestari, I., Da Silva, J. S., Souza, L. A., Peres, L. E. P., ... & Figueira, A. (2017). Expression of the *Theobroma cacao* Bax-inhibitor-1 gene in tomato reduces infection by the hemibiotrophic pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Molecular Plant Pathology*, *18*(8), 1101-1112.
- Sena, K., Alemanno, L., & Gramacho, K. P. (2014). The infection process of *Moniliophthora perniciosa* in cacao. *Plant Pathology*, *63*(6), 1272-1281.

- Silva, G. F. F. (2016). *A inter-relação entre a via miR156/SBP e o fitormônio giberelina no controle da transição de fase vegetativo-reprodutivo em tomateiro*. (Tese de doutorado, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo).
- Skibbe, D. S., Doehlemann, G., Fernandes, J., & Walbot, V. (2010). Maize tumors caused by *Ustilago maydis* require organ-specific genes in host and pathogen. *Science*, *328*(5974), 89-92.
- Slisz, A. M., Breksa III, A. P., Mishchuk, D. O., McCollum, G., & Slupsky, C. M. (2012). Metabolomic analysis of citrus infection by 'Candidatus Liberibacter' reveals insight into pathogenicity. *Journal of Proteome Research*, *11*(8), 4223-4230
- Smirnoff, N. (2018). Ascorbic acid metabolism and functions: a comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine*. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033.
- Solomon, P. S., & Oliver, R. P. (2001). The nitrogen content of the tomato leaf apoplast increases during infection by *Cladosporium fulvum*. *Planta*, *213*(2), 241-249.
- Sørensen, M., Neilson, E. H., & Møller, B. L. (2018). Oximes: Unrecognized chameleons in general and specialized plant metabolism. *Molecular Plant*, *11*, 95-117.
- Stacklies, W., Redestig, H., Scholz, M., Walther, D., & Selbig, J. (2007). pcaMethods - a bioconductor package providing PCA methods for incomplete data. *Bioinformatics*, *23*(9), 1164-1167.
- Stoop, J. M., Williamson, J. D., & Pharr, D. M. (1996). Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science*, *1*(5), 139-144.
- Sturm, A., & Chrispeels, M. J. (1990). cDNA cloning of carrot extracellular beta-fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *The Plant Cell*, *2*(11), 1107-1119.
- Tauzin, A. S., & Giardina, T. (2014). Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses. *Frontiers in plant science*, *5*, 293.
- Teixeira, P. J. P. L., de Toledo Thomazella, D. P., Reis, O., Do Prado, P. F. V., Do Rio, M. C. S., Fiorin, G. L., ... & Mieczkowski, P. (2014). High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *The Plant Cell*, *26*(11), 4245-4269.
- Teixeira, P. J. P. L., de Toledo Thomazella, D. P., & Pereira, G. A. G. (2015). Time for chocolate: current understanding and New perspectives on cacao Witches' broom disease research. *PLoS Pathogens*, *11*(10), e1005130.
- Tenenboim, H., & Brotman, Y. (2016). Omic relief for the biotically stressed: metabolomics of plant biotic interactions. *Trends in Plant Science*, *21*(9), 781-791.

- Thibaud, M. C., Gineste, S., Nussaume, L., & Robaglia, C. (2004). Sucrose increases pathogenesis-related PR-2 gene expression in *Arabidopsis thaliana* through an SA-dependent but NPR1-independent signaling pathway. *Plant Physiology and Biochemistry*, *42*(1), 81-88.
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., ... & Stitt, M. (2004). mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal*, *37*(6), 914-939.
- Thomazella, D., Teixeira, P. J. P., Oliveira, H. C., Saviani, E. E., Rincones, J., Toni, I. M., ... & Pereira, G. A. (2012). The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. *New Phytologist*, *194*(4), 1025-1034.
- Tomato Genome Consortium. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, *485*(7400), 635.
- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*, *4*(3), 147.
- Trouvelot, S., Héloir, M. C., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C., ... & Adrian, M. (2014). Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 592.
- Truman, W., Zabala, M. T., & Grant, M. (2006). Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *The Plant Journal*, *46*(1), 14-33.
- Uawisetwathana, U., Graham, S. F., Kamolsukyonyong, W., Sukhaket, W., Klanchui, A., Toojinda, T., ... & Elliott, C. T. (2015). Quantitative ¹H NMR metabolome profiling of Thai Jasmine rice (*Oryza sativa*) reveals primary metabolic response during brown planthopper infestation. *Metabolomics*, *11*(6), 1640-1655.
- Valluru, R., & Van den Ende, W. (2011). Myo-inositol and beyond—emerging networks under stress. *Plant Science*, *181*(4), 387-400.
- van der Sar, S., Kim, H. K., Meissner, A., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Nuclear magnetic resonance spectroscopy for plant metabolite profiling. *The Handbook of Plant Metabolomics*, 57-76. doi: 10.1002/9783527669882.ch3.
- van Loon, L. C., Geraats, B. P., & Linthorst, H. J. (2006). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science*, *11*(4), 184-191.
- Veillet, F., Gaillard, C., Coutos-Thévenot, P., & La Camera, S. (2016). Targeting the AtCWIN1 Gene to explore the role of invertases in sucrose transport in roots and during *Botrytis cinerea* infection. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1899.

- Veillet, F., Gaillard, C., Lemonnier, P., Coutos-Thévenot, P., & La Camera, S. (2017). The molecular dialogue between *Arabidopsis thaliana* and the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* leads to major changes in host carbon metabolism. *Scientific Reports*, *7*(1), 17121.
- Voll, L. M., Horst, R. J., Voitsik, A. M., Zajic, D., Samans, B., Pons-Kühnemann, J., ... & Hofmann, J. (2011). Common motifs in the response of cereal primary metabolism to fungal pathogens are not based on similar transcriptional reprogramming. *Frontiers in Plant Science*, *2*, 39.
- Walters, D. R. (1985). Shoot: root interrelationships: the effects of obligately biotrophic fungal pathogens. *Biological Reviews*, *60*(1), 47-79.
- Walters, D. R., & McRoberts, N. (2006). Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins?. *Trends in Plant Science*, *11*(12), 581-586.
- Walters, D. R., McRoberts, N., & Fitt, B. D. (2008). Are green islands red herrings? Significance of green islands in plant interactions with pathogens and pests. *Biological Reviews*, *83*(1), 79-102.
- Wang, Y., Chen, J., Feng, J., Qin, Q., & Huang, J. (2015). Overexpression of a loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) vacuolar invertase affects sucrose levels and growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *123*(1), 99-108.
- Ward, J. L., Forcat, S., Beckmann, M., Bennett, M., Miller, S. J., Baker, J. M., ... & Truman, W. M. (2010). The metabolic transition during disease following infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *The Plant Journal*, *63*(3), 443-457.
- Watanabe, M., Balazadeh, S., Tohge, T., Erban, A., Giavalisco, P., Kopka, J., ... & Hoefgen, R. (2013). Comprehensive dissection of spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during developmental senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *162*(3), 1290-1310.
- Wingler, A., Delatte, T. L., O'Hara, L. E., Primavesi, L. F., Jhurrea, D., Paul, M. J., & Schluepmann, H. (2012). Trehalose 6-phosphate is required for the onset of leaf senescence associated with high carbon availability. *Plant Physiology*, *158*(3), 1241-1251.
- Wojtasik, W., Kulma, A., Namysł, K., Preisner, M., & Szopa, J. (2015). Polyamine metabolism in flax in response to treatment with pathogenic and non-pathogenic *Fusarium* strains. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 291.
- Wu, S., Shan, L., & He, P. (2014). Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms. *Plant Science*, *228*, 118-126.
- Xiao, W., Sheen, J., & Jang, J. C. (2000). The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Molecular Biology*, *44*(4), 451-461.
- Yabuki, Y., Ohashi, M., Imagawa, F., Ishiyama, K., Beier, M. P., Konishi, N., ... & Kojima, S. (2017). A temporal and spatial contribution of asparaginase to asparagine catabolism during development of rice grains. *Rice*, *10*(1), 3.

- Yamada, K., Saijo, Y., Nakagami, H., & Takano, Y. (2016). Regulation of sugar transporter activity for antibacterial defense in Arabidopsis. *Science*, *354*(6318), 1427-1430.
- Yang, S. L., Lan, S. S., & Gong, M. (2009). Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. *Journal of Plant Physiology*, *166*(15), 1694-1699.
- Yoda, H., Yamaguchi, Y., & Sano, H. (2003). Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. *Plant Physiology*, *132*(4), 1973-1981.
- Yoda, H., Fujimura, K., Takahashi, H., Munemura, I., Uchimiya, H., & Sano, H. (2009). Polyamines as a common source of hydrogen peroxide in host-and nonhost hypersensitive response during pathogen infection. *Plant Molecular Biology*, *70*(1-2), 103-112.
- Zaparoli, G., Barsottini, M. R. D. O., de Oliveira, J. F., Dyszy, F., Teixeira, P. J. P. L., Barau, J. G., ... & Dias, S. M. G. (2011). The crystal structure of necrosis-and ethylene-inducing protein 2 from the causal agent of cacao's Witches' Broom disease reveals key elements for its activity. *Biochemistry*, *50*(45), 9901-9910.
- Zarebanadkouki, M., Kroener, E., Kaestner, A., & Carminati, A. (2014). Visualization of root water uptake: quantification of deuterated water transport in roots using neutron radiography and numerical modeling. *Plant Physiology*, *166*(2), 487-499.
- Zeier, J. (2013). New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant, Cell & Environment*, *36*(12), 2085-2103.
- Zhang, Y. H., Zhong, J. J., & Yu, J. T. (1996). Enhancement of ginseng saponin production in suspension cultures of *Panax notoginseng*: manipulation of medium sucrose. *Journal of Biotechnology*, *51*(1), 49-56.
- Zhang, Z., Zou, Y., Wu, T., Huang, C., Pei, K., Zhang, G., ... & Ou, S. (2016). Chlorogenic acid increased 5-hydroxymethylfurfural formation when heating fructose alone or with aspartic acid at two pH levels. *Food Chemistry*, *190*, 832-835.
- Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U., & Boldt, R. (2006). Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *57*, 805-836.

ANEXOS

Anexo A - Tabela 3 - Caracterização de compostos orgânicos de plantas MT infectadas ou não por *M. perniciosa* nos tempos 4, 10, 20 e 30 DAI obtidos por 1D e 2D RMN 600 MHz. ¹H valores dos deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (*J*) em Hz. ¹³C - deslocamentos químicos (δ) (ppm) verificados no experimento HSQC. ^COSY: Correlação 1H-1H (ppm)

Nome composto	¹ H	¹³ C	COSY
α -glicose	4.58 (d; 7,95 Hz)	98.0	-
β -glicose	5.18 (d; 3.76 Hz)	93.8	-
Ácido málico	2.46 (dd; 15.15; 3.70 Hz) 2.70 (dd; 16.30; 2.63 Hz)	43.40 43.40	2.70; 4.30 2.46
Ácido glutâmico	2.06 m 2.13 m 2.37 (td; 7.2, 2.4 Hz)	- - -	3.70 3.70 2.06; 2.13
Glicina	3.51 (s)	-	-
Alanina	1.48 (d, 7.27 Hz) 3.70 (m)	- 55.8	3.70 1.48
Etanol	1.19 (t; 7,11)	-	3.65
Sacarose	5.40 (d, 3.93 Hz) 4.17 (d, 8.62 Hz)	93.3 78.0	- -
GABA	1.90 (m) 2.30 (t; 7.30) 3.01 (t; 7.30)	- - -	2.30; 3.01 1.90 1.90
Isoleucina	1.02 (d; 7.15) 1.50 (m) 2.01 (m) 3.56 (d; 4,0)	17.13 26.3 38.66 62.4	2.01 0.95 1.00; 3.56 2.01
Ácido fumárico	6.53 (s)	-	-
Ácido fórmico	8.47 (s)	-	-
Dimetilamina	2.97 (s)	-	-
Treonina	1.34 (d; 6,6 Hz)	-	-
Leucina	0.97 (d; 6.7) 0.98 (d;6.7)	- -	- -
Valina	1.00 (d; 7.0) 1.05 (d; 7.0) 3.56 (d; 4.0)	- - -	- 3.56 1.,05
Ácido aspártico	2.63 (dd, 17.3; 9.15) 2.80 (dd, 17.3; 3.8) 3.85 (dd, 9.20; 4.0)	- - -	3.85 3.85 2.80; 2.63
Tirosina	6.91 (d; 8.0)	116.4	7.17
Rutina	7.66 (d; 2.07) 7.61 (d; 8.5) 6.97 (d; 8.5) 6.54 (d; 2.07) 6.31 (d; 2.07) 5.00 (d; 7.6) 4.51 (d; 2.0) 3.62* (dd; 1.67)	- - 116.2 - - - 101.5 71.5	- 6.97 7.61 6.31 6.53 3.49 3.53 -
Fenilalanina	3.96 (dd, 5.45; 7.3 Hz) 7.31 (d, 6.98) 7.35 (m) 7.43 (m)	- 131.0 - -	- - - -
Glutamina	2.14 (m) 2.43 (m) 3.71 (m)	- - -	- - -
Inositol	3.60* (t, 9.75) 3.50 (dd, 3.70; 9.97) 3.23 (d, 9.4) 4.05* (m)	73.2 71.9 75.1 72.1	3.23; 3.50 4.05 3.60 3.50
Colina	3.19 (s)	54.83	-

Continua.

Nome composto	¹ H	¹³ C	COSY
Fosfocolina	3.21 (s)	54.83	-
Adenosina	8.54 (s)	-	-
	8.24 (s)	-	-
	5.99 (d; 4.7 Hz)	-	-
UDP-glicose	5.93 (d, 8.11)	-	-
	7.98 (d; 8.11)	-	-
Trigonelina	4.45 (s)	-	-
	8.10 m	-	8.86
	8.86 m	-	8.10
	9.15 s	-	-
Etanolamina	3.12 (t; 5.3)	43.0	3.81
	3.81* (m)	61.8	3.12
Ácido clorogênico	7.06 (dd; 2,8.2)	-	6.92
	6.88 (d; 8.2)	-	7.15; 7.61
	7.15 (d; 2.0)	-	7.61
	7.15 (d; 2.0)	-	-
Ácido glicérico	4.14 m	76.2	3.81
Uridina	7.93 (d, 8.0)	-	5.86
	5.86 (d, 4.67)	-	7.93; 4,34
	4.22 (dd; 6.53; 5.22)	-	-
	4.34 (m)	-	5.90
	-	-	-
	4.11 (m)	-	-
	3.77 (dd; 12.4; 4.2)	63.2	-
3.91 (dd; 12; 5,3)	64.3	-	
Ácido quínico	1.88 * (dd; 13.6; 10.4)	-	-
	1.94 (m)	-	2.05
	2.05 (m)	-	1.87
	3.51 (dd; 3.5; 9.7)	76.7	4.02
	4.02 (m)	70.4	3.51; 1,88
	4.11 (m)	-	-
Ácido ferúlico	3.91 (s)	56.6	-
	6.38 (d; 16.0)	-	7.62
	6.89 (d, 8.2)	116.6	7.07
	7.07 (dd; 2.0, 8.2)	123.0	6.89
	7.15 (d, 2.0)	115.0	-
	7.62 (d, 16.0)	-	6.38

Anexo B - Tabela 4 - Metabólitos de plantas MT infectadas com *M. pernicioso* (Inoc) e não infectadas (Cont) nos tempos 4, 10 e 20 DAI obtidos através de GC-MS-TOF. Valores representam média (avg) e desvio padrão (se) de dados normalizados a partir da divisão da massa fresca (50 mg), seguida da soma total de contagem de íons para 6 replicatas biológicas. Metabólitos significativamente diferentes por teste t ($p < 0,05$) em plantas MT infectadas em comparação com não infectadas no mesmo tempo estão em negrito. Vermelho indica metabólitos que diminuíram e azul indica metabólitos que aumentaram em plantas MT infectadas

	MT 4 DAI		MT 4 DAI		MT 10 DAI		MT 10 DAI		MT 20 DAI		MT 20 DAI	
	Cont		Inoc		Cont		Inoc		Cont		Inoc	
	avg	se	avg	se	avg	se	avg	se	avg	se	avg	se
2-Hydroxypyridine	1,05	0,13	1,20	0,30	0,87	0,08	0,81	0,12	1,15	0,20	1,33	0,37
Glycolic acid	1,21	0,04	1,02	0,11	0,84	0,12	0,82	0,13	1,13	0,20	1,11	0,24
Alanine	1,52	0,14	1,55	0,10	0,86	0,11	0,92	0,12	0,82	0,17	1,01	0,20
Pyruvate	0,89	0,30	0,87	0,31	0,97	0,13	0,75	0,07	1,11	0,24	1,17	0,29
Valine	1,00	0,03	1,10	0,05	0,70	0,09	0,66	0,06	1,10	0,14	1,20	0,31
Glycerol	1,11	0,25	1,65	0,48	0,82	0,11	0,96	0,12	1,03	0,18	0,93	0,15
Leucine	1,08	0,07	1,04	0,05	0,92	0,14	0,79	0,07	1,08	0,19	0,98	0,13
Isoleucine	1,08	0,10	1,16	0,06	0,75	0,08	0,67	0,04	1,08	0,16	0,98	0,19
Glycine	1,30	0,26	1,48	0,25	0,91	0,10	0,97	0,09	0,72	0,21	0,97	0,18
Orthophosphate	0,63	0,31	0,19	0,06	1,06	0,38	0,72	0,27	1,66	0,60	3,07	0,97
Proline	1,08	0,05	1,00	0,07	0,94	0,07	1,04	0,07	0,97	0,16	0,50	0,26
Serine	1,09	0,15	1,11	0,15	0,88	0,14	0,90	0,09	0,82	0,23	1,32	0,30
Riboflavin	1,23	0,31	1,03	0,30	1,00	0,18	0,77	0,14	1,12	0,33	1,40	0,55
C4H4O4	1,13	0,17	0,92	0,20	1,15	0,21	0,90	0,18	0,80	0,11	1,10	0,24
[Fumarate Maleate]												
Nicotinate	1,05	0,29	0,98	0,21	0,73	0,14	1,00	0,26	1,02	0,30	1,14	0,26
b-Alanine	1,00	0,05	1,08	0,12	1,00	0,24	0,93	0,17	0,73	0,16	1,50	0,33
Citramalate	1,21	0,21	1,03	0,25	1,12	0,11	0,82	0,11	1,21	0,47	0,68	0,16
Malate	0,69	0,26	0,63	0,20	1,54	0,43	0,78	0,24	1,30	0,41	2,44	1,01
trans-4-Hydroxyproline	0,89	0,11	1,11	0,10	1,50	0,35	1,10	0,11	0,76	0,06	0,47	0,09
4-Aminobutanoate	0,98	0,04	0,89	0,27	1,22	0,16	1,01	0,14	0,82	0,19	0,98	0,15
Aspartate	1,11	0,17	1,20	0,13	0,97	0,14	0,84	0,07	0,92	0,27	1,19	0,29
Threonate	1,19	0,34	1,35	0,27	1,05	0,24	0,82	0,09	0,92	0,17	1,26	0,30
Methionine	1,03	0,11	1,33	0,17	0,94	0,21	0,87	0,14	0,96	0,19	0,99	0,14
Arginine	2,01	0,34	1,90	0,50	1,11	0,27	0,91	0,20	0,37	0,13	0,37	0,07
C5H10O5	0,94	0,15	0,93	0,13	1,00	0,18	1,07	0,10	0,98	0,13	1,14	0,19
[Xylose Arabinose Lyxose]												
Glutamate	1,05	0,13	1,10	0,15	0,85	0,16	0,86	0,13	0,99	0,15	1,42	0,35
Putrescine	1,26	0,23	1,35	0,34	0,72	0,13	1,04	0,12	0,78	0,19	0,84	0,16

Continua

Conclusão

	MT 4 DAI		MT 4 DAI		MT 10 DAI		MT 10 DAI		MT 20 DAI		MT 20 DAI	
	Cont		Inoc		Cont		Inoc		Cont		Inoc	
	avg	se	avg	se	avg	se	avg	se	avg	se	avg	se
C6H12O5	0,94	0,10	0,95	0,05	0,96	0,16	0,96	0,05	1,21	0,16	1,46	0,33
[Fucose]Epifucose]												
Glutamine	2,60	0,61	3,43	1,51	1,13	0,55	1,03	0,34	0,43	0,13	0,52	0,14
Phenylalanine	1,02	0,06	1,42	0,45	0,62	0,04	0,62	0,09	1,35	0,19	0,96	0,13
Asparagine	1,47	0,40	2,51	1,31	1,04	0,29	0,73	0,17	0,91	0,31	0,95	0,18
Ornithine	2,65	0,28	2,33	0,31	0,94	0,13	1,03	0,13	0,59	0,13	0,81	0,11
Quinic acid	1,34	0,23	1,48	0,31	0,94	0,15	0,76	0,17	1,08	0,31	0,71	0,22
Fructose [Psicose]	0,21	0,03	0,21	0,04	1,16	0,30	1,17	0,22	0,71	0,40	1,47	0,41
C6H12O6	0,20	0,03	0,19	0,04	1,16	0,29	1,17	0,23	0,70	0,41	1,50	0,45
[Sorbose]Tagatose]												
Gulose	0,22	0,11	0,22	0,06	1,12	0,22	1,86	0,19	0,72	0,34	1,66	0,57
Citrate	1,03	0,38	0,74	0,22	1,39	0,43	0,53	0,11	2,11	1,03	2,09	0,76
Isocitrate	0,97	0,27	1,02	0,20	1,00	0,21	0,81	0,12	1,19	0,44	1,40	0,29
Glucose	0,52	0,10	0,48	0,13	1,02	0,14	1,14	0,08	1,03	0,36	1,25	0,21
Citrulline	1,54	0,16	1,41	0,35	1,18	0,31	0,95	0,12	0,39	0,07	0,41	0,08
Lysine	1,00	0,04	1,14	0,13	0,82	0,09	0,80	0,08	1,38	0,28	1,17	0,22
Glucuronate	0,97	0,23	1,29	0,34	2,15	0,59	1,07	0,24	0,30	0,06	0,59	0,16
Tyramine	0,96	0,15	0,97	0,20	1,22	0,40	1,04	0,28	1,19	0,35	1,23	0,45
Glucarate	0,77	0,26	0,45	0,04	1,56	0,36	1,02	0,22	0,98	0,17	1,21	0,41
myo-Inositol	1,02	0,21	0,99	0,26	1,03	0,31	0,82	0,20	1,05	0,23	0,94	0,21
Adenine	1,07	0,20	1,24	0,23	1,00	0,13	0,98	0,12	0,70	0,15	0,92	0,17
4-Coumarate	1,04	0,38	0,94	0,22	0,67	0,10	0,91	0,15	1,07	0,26	1,17	0,14
Spermidine	0,95	0,22	1,72	0,48	1,02	0,24	1,47	0,27	0,25	0,04	0,36	0,06
Caffeate	1,15	0,18	1,04	0,27	1,05	0,20	0,92	0,15	1,18	0,30	0,94	0,10
myo-Inositol-1-phosphate	1,40	0,61	0,63	0,11	1,33	0,27	0,81	0,18	0,65	0,18	1,85	0,52
Sucrose	0,69	0,05	0,63	0,07	0,99	0,11	1,01	0,05	1,40	0,12	1,60	0,27
Galactinol	0,68	0,18	0,68	0,24	0,98	0,31	0,89	0,16	1,90	0,32	1,50	0,25
Quinic acid, 3-caffeoil-, trans-	1,23	0,30	1,23	0,34	0,93	0,19	0,85	0,24	0,80	0,17	0,95	0,27
C18H32O16	0,77	0,13	0,72	0,12	1,51	0,31	2,00	0,35	0,98	0,23	1,16	0,22
[Raffinose]1-Kestose]Inulotriose]			5	8	0	9	9	7	6	3	1	0

Anexo C - Tabela 5 - Genes diferencialmente expressos de MT infectadas com *M. perniciosa* em relação a MT não infectadas ($n=5$) associados ao metabolismo de carboidratos. Vermelho indica genes reprimidos e azul indica genes induzidos em plantas MT infectadas

Gene ID	Description	Function	Fold Change			
			5 DAI	10 DAI	20 DAI	30 DAI
Solyc01g109790.3	ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit 1	Starch biosynthesis			-2,37	-2,952
Solyc07g056140.3	ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit	Starch biosynthesis			-2,142	-2,936
Solyc08g007130.3	Beta-amylase	Starch degradation		-4,373		
Solyc08g077530.3	Beta-amylase	Starch degradation	2,976			
Solyc07g052695.1	Beta-amylase	Starch degradation			-2,175	
Solyc07g052690.3	Beta-amylase	Starch degradation			-2,239	-2,509
Solyc09g091030.3	Beta-amylase 1	Starch degradation				-2,981
Solyc06g072620.3	Bidirectional sugar transporter SWEET	Sugar transport				-5,008
Solyc06g060590.3	Bidirectional sugar transporter SWEET	Sugar transport				-3,518
Solyc04g064630.3	Bidirectional sugar transporter SWEET	Sugar transport				-4,919
Solyc03g121680.2	Cell wall invertase	Sucrose degradation				-5,868
Solyc10g085650.2	Cell-wall invertase	Sucrose degradation			-15,64	
Solyc08g015670.3	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase, putative	ADP glucose biosynthesis			4,1314	
Solyc08g083320.3	granule-bound starch synthase 1	Starch biosynthesis		-2,301	-2,474	
Solyc10g083290.3	invertase 6	Sucrose degradation			7,773	
Solyc06g011470.3	LOW QUALITY:beta-amylase 5	Starch degradation			2,8958	
Solyc01g111100.3	Neutral invertase	Sucrose degradation				-5,569
Solyc03g006870.3	phosphoglucomutase	Glucose metabolic pathway				-2,732
Solyc11g065220.2	Phosphotransferase	Sugar phosphorylation			4,1088	
Solyc12g056625.1	Plant neutral invertase family protein	Sucrose degradation	-2,063			
Solyc02g062890.2	polyol monosaccharide transporter 5	Sugar transport			17,941	119,66
Solyc11g017010.2	SISUT1	Sucrose transporter				-2,153
Solyc02g079220.3	Sugar transporter protein 1	Sugar transport			4,992	
Solyc02g079220.3	Sugar transporter protein 1	Sugar transport			4,992	
Solyc05g018230.3	Sugar transporter protein 12	Sugar transport			2,9872	
Solyc05g018230.3	Sugar transporter protein 12	Sugar transport			2,9872	
Solyc03g032040.3	Tonoplast monosaccharide transporter 1	Sugar transport				2,1945

Continua

Gene ID	Description	Function	Fold Change			
			5 DAI	10 DAI	20 DAI	30 DAI
Solyc04g072920.3	Trehalose 6-phosphate phosphatase	Trehalose biosynthesis			3,5246	-4,141
Solyc02g072150.3	Trehalose-6-phosphate synthase, putative	Trehalose biosynthesis	2,786		6,2304	
Solyc07g062140.3	trehalose-phosphate synthase 1	Trehalose biosynthesis			2,032	2,0666
Solyc12g055930.2	UDP-glucose 4-epimerase	Epimerization of UDP-galactose and UDP-glucose			3,1961	

Anexo D - Tabela 6 - Genes diferencialmente expressos de MT infectadas com *M. pernicioso* em relação a MT não infectadas ($n=5$) associados à fotossíntese. Vermelho indica gene reprimidos e azul indica genes induzidos em plantas MT infectadas

Gene ID	Description	Function	Fold Change			
			5 DAI	10 DAI	20 DAI	30 DAI
Solyc12g006140.2	Cab-5 gene encoding chlorophyll a/b-binding protein	Light reaction -P hothosystem II		-5,266		
Solyc03g005775.1	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	Light reaction – Phothosystem II		-5,128		
Solyc12g011450.2	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	Light reaction – Phothosystem II		-4,416		
Solyc11g012850.2	Chlorophyllide a oxygenase	Chlorophyll biosynthesis		-2,755		
Solyc01g111630.3	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	Photorespiration			-2,182	
Solyc04g071340.3	Fructose-1,6-bisphosphatase	Calvin cycle				-3,099
Solyc10g086730.2	Fructose-1,6-bisphosphatase	Calvin cycle		-2,291	-2,95	
Solyc02g084440.3	Fructose-bisphosphate aldolase	Calvin cycle		-2,24	-2,284	
Solyc04g009030.3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Calvin cycle				-2,348
Solyc02g020940.3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Calvin cycle				-2,12
Solyc12g094640.2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Calvin cycle				-6,145
Solyc06g071920.3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Calvin cycle				-2,003
Solyc05g007780.3	Photosynthetic NDH subcomplex L 2	Photosynthetic eléctron transport chain				-3,61
Solyc02g069460.3	Photosystem I reaction center subunit III	Light reaction – Phothosystem I				-2,32
Solyc02g069450.3	Photosystem I reaction center subunit III	Light reaction – Phothosystem I				-3,07
Solyc09g063130.3	Photosystem I reaction center subunit IV	Light reaction – Phothosystem I				-2,082
Solyc07g066150.1	Photosystem I reaction center subunit V family protein	Light reaction – Phothosystem I				-2,224
Solyc06g066640.3	Photosystem I reaction center subunit VI	Light reaction – Phothosystem I				-3,064
Solyc12g099650.2	Photosystem II 5 kDa protein	Light reaction – Phothosystem II				-2,229
Solyc07g054290.1	photosystem II family protein	Light reaction – Phothosystem II				-2,15
Solyc12g094720.2	Photosystem II reaction center PsbP family protein	Light reaction – Phothosystem II				-3,026

Continua

Gene ID	Description	Function	Fold Change			
			5 DAI	10 DAI	20 DAI	30 DAI
Solyc12g042770.2	post-illumination chlorophyll fluorescence increase	Chlororespiration			-2,254	
Solyc09g011080.3	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase	Calvin cycle		-15,93		
Solyc02g063150.3	RuBP carboxylase small subunit	Calvin cycle				-2,727
Solyc12g009600.2	Thylakoid lumenal 16.5 kDa protein	Light reaction – Photosystem II				-2,128

Anexo E - Tabela 7 - Genes diferencialmente expressos de MT infectadas com *M. perniciosa* em relação a MT não infectadas ($n=5$) associados ao metabolismo de nitrogênio. Vermelho indica gene reprimidos e azul indica genes induzidos em plantas MT infectadas

Gene ID	Description	Function	Fold Change			
			5 DAI	10 DAI	20 DAI	30 DAI
Solyc04g077460.3	Amino acid transporter	Aminoacid transporter			4,0451	-2,015
Solyc06g060110.3	amino acid transporter 2	Aminoacid transporter				-2,269
Solyc08g082080.3	Amino acid transporter family protein	Aminoacid transporter			-2,736	
Solyc05g052300.3	Amino acid transporter family protein	Aminoacid transporter				-4,274
Solyc02g082510.1	Amino acid transporter, putative	Aminoacid transporter			2,5157	
Solyc01g111980.3	Amino acid transporter, putative	Aminoacid transporter			5,4332	
Solyc04g050440.3	ammonium transporter	Ammonium transporter				-3,255
Solyc09g090730.2	AMT1	Ammonium transporter				3,2366
Solyc10g054440.2	arginine decarboxylase 1	Arginine catabolic process			3,2794	
Solyc03g115060.3	Assimilatory nitrate reductase catalytic subunit	Nitrate metabolism			4,0388	
Solyc02g086300.3	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein	Glutamine metabolic pathway			5,3687	
Solyc06g063210.3	glutamate receptor-like 2.5	Glutamate receptor activity			2,9725	
Solyc01g102280.3	Glutamate synthase 1 [NADH], chloroplastic	Glutamate biosynthesis			2,7523	
Solyc07g006600.1	glutamine dumper 3	Aminoacid transporter			-2,14	-2,263
Solyc02g089470.1	Glutamine dumper, putative	Aminoacid transporter			2,9725	
Solyc04g014510.3	glutamine synthase	Glutamine biosynthesis				-4,082
Solyc02g067800.3	High affinity nitrate transporter	Nitrate transporter			2,0885	
Solyc04g078460.3	L-asparaginase	Asparagine catabolism				5,2421
Solyc01g108630.3	nii1 nitrite reductase	Nitrogen assimilation				-4,286
Solyc08g078950.3	NIT1	Nitrate transporter				2,5407
Solyc03g113250.3	nitrate transporter 1:2	Nitrate transporter			-5,437	
Solyc02g090500.3	Phenylalanine ammonia-lyase	Phenylalanine catabolism			2,6954	
Solyc02g089620.3	proline dehydrogenase	Proline catabolic process			6,5937	
Solyc03g096380.3	proline transporter 2	Aminoacid transporter			-2,024	-4,273
Solyc07g021630.3	SIBCAT2	Branched-chain amino acids biosynthesis	-38,63			
Solyc09g008670.3	threonine deaminase	Threonine dehydration			-41,874	

Continua

Gene ID	Description	Function	Fold Change			
			5 DAI	10 DAI	20 DAI	30 DAI
Solyc09g098380.2	Transmembrane amino acid transporter family protein	Aminoacid transporter		71,338		22,516
Solyc10g078470.2	Tryptophan/tyrosine permease	Aminoacid transporter				3,592
Solyc10g007110.3	Tyrosine aminotransferase	Aminoacid metabolism	-4,408			
Solyc10g008200.3	Tyrosine aminotransferase, putative	Tyrosine catabolic process				2,1942