UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

JULIANA DEGANELLO

Avaliação da contribuição dos hormônios vegetais na interação

Moniliophthora perniciosa x Solanum lycopersicum

Piracicaba
2012

JULIANA DEGANELLO

Avaliação da contribuição dos hormônios vegetais na 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
2012**

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

Deganello, Juliana

Avaliação da contribuição dos hormônios vegetais na interação *Moniliophthora perniciosa* x *Solanum lycopersicum* / Juliana Deganello; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Piracicaba, 2012.

118 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. Basidiomycota 2. Biologia molecular vegetal 3. Expressão gênica
4. Microscopia eletrônica 5. Solanaceae 6. Vassoura-de-bruxa I. Título

CDU (577.17 + 581.2) : 632.27

Aos meus pais Nivaldo e Vânia e a minha irmã Lígia, pelo amor, confiança e apoio incondicional na realização de todos meus sonhos. Sem vocês minhas conquistas não seriam possíveis.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e força em todos os momentos da minha vida;

Ao Prof. Dr. Antonio Figueira pela orientação, confiança, dedicação e pelo exemplo profissional;

Ao Programa de Pós-Graduação do CENA/USP pelas oportunidades concedidas durante o mestrado;

Ao Prof. Dr. Gildemberg Leal Jr., ou melhor, Jupará, pelos valiosos ensinamentos, e contribuição irrestrita em todos os momentos da realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres, pela disponibilidade dos materiais e esclarecimentos em muitos momentos da minha pesquisa;

Ao Dr. Paulo Albuquerque pela atenção e contribuições ao longo do meu trabalho;

Aos técnicos Wlamir Godoy e Raquel Orsi pela disponibilidade em sempre ajudar;

A técnica Mônica L. Rossi, do Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas do CENA/USP, pela disposição e enorme empenho nas análises de microscopia;

A Dra Neusa L. Nogueira pela oportunidade concedida para realização dos trabalhos em microscopia;

Ao Dr. Elliot Watanabe Kitajima por disponibilizar os microscópios para realização desse trabalho;

Aos funcionários do NAP/MEPA-ESALQ/USP pela disponibilidade e auxílio nos experimentos de microscopia;

A bibliotecária Marília Henyei pela ajuda com a correção do trabalho;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão de bolsa de estudo e apoio financeiro para realização desta pesquisa;

Aos meus pais Nivaldo e Vânia, e minha irmã Lígia, que mesmo longe, sempre se fizeram presentes em seu enorme amor e carinho, obrigada por acreditarem em mim e nunca me deixar desanimar;

As minhas queridas avós Elza e Maria, por sempre torcerem por mim e acreditarem em meu potencial;

As minhas grandes amigas Danielle Scotton e Layanne Souza, as “Gras”, que tornaram minha pós-graduação muito mais divertida, agradeço pela amizade, e troca de experiências, carinho, além da disponibilidade em ajudar sempre que possível nos experimentos em casa de vegetação;

Aos meus queridos colegas de ‘salinha’ João Felipe Nebó, Juliana Leles e Eduardo Bressan, pelo bom humor e conversas animadas, além da disponibilidade em sempre auxiliar com meu trabalho;

Aos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Melhoramento de Plantas: Aline Campos Harissis, Amanda de Almeida Jesus, André Luiz Tagliaferro, Ângela Sanche Artero, Celso Gaspar, Deborah Sanae Nishimura, Gislayne de Araujo Bitencourt, Ilse Fernanda Ferrari, Isabela Amaral de Camargo, Joni Esrom Lima, Letícia Bilato Sergio, Luis Henrique Damasceno, Maria Lorena Sereno, Mariana Belloti, Mariele Vitti, Melissa Alves, Renato Ferreira, Roberto de Almeida Camargo, Tais Tomazin, Thaísa Tessuti, Verusca Rossi pelo convívio e troca de experiências.

Todo meu carinho e agradecimento!

RESUMO

DEGANELLO, J. **Avaliação da contribuição dos hormônios vegetais na interação *Moniliophthora perniciosa* x *Solanum lycopersicum***. 2012. 118 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

A vassoura-de-bruxa consiste numa importante enfermidade do cacauzeiro (*Theobroma cacao*), causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* e caracterizada pelos sintomas de inchamento e indução de brotações laterais nos ramos infectados. O mecanismo de resistência do cacauzeiro a *M. perniciosa* ainda é desconhecido e o longo ciclo de vida da espécie dificulta o seu estudo. Isolados do biótipo-S do patógeno infectam o tomateiro (*Solanum lycopersicum*), cuja cultivar miniatura ‘Micro-Tom’ (MT) consiste num potencial modelo genético para o estudo da interação. A avaliação desse modelo foi iniciada com a caracterização sintomatológica de MT à inoculações com isolados de *M. perniciosa* do biótipo-S. Os sintomas avaliados nas plantas infectadas foram engrossamento do caule e desenvolvimento de ‘vassouras laterais’. Na caracterização histopatológica da interação MT e *M. perniciosa* por microscopia eletrônica de varredura foi observada a germinação preferencial de basidiósporos na base dos tricomas com pontos de penetração através de ferimentos e diretamente pela epiderme. Foi observado por microscopia óptica, aumento no volume celular de plantas infectadas e, a microscopia eletrônica de transmissão detectou a colonização da região intercelular pelo fungo com formação de matriz extracelular envolvendo a hifa. A contribuição dos hormônios vegetais na patogênese foi avaliada por meio de mutantes e plantas transgênicas no *background* ‘Micro-Tom’ com alterações nas vias de biossíntese ou percepção hormonal. As classes hormonais e genótipos avaliados foram brassinosteróide (*curl3*), auxina (*diagtropica*), etileno (*epinastic* e *Never ripe*), ácido abscísico (*notabilis*) giberelina (*procera*), ácido jasmônico (*jasmonic acid insensitive 1* e *prosistemina*), citocinina (*CKX2*) e ácido salicílico (*NahG*). Os genótipos que se mostraram mais susceptíveis a infecção por *M. perniciosa* avaliado por taxa de infecção de plantas, quando comparados ao MT foram *epinastic*, *notabilis*, *procera* e *jasmonic acid insensitive 1*, sendo que os restantes foram menos susceptíveis, sugerindo que possivelmente a redução da susceptibilidade à *M. perniciosa* relaciona-se ao aumento nos níveis de jasmonato (JA), em contraponto com o ácido salicílico (AS), que quando em níveis elevados parece aumentar o número de plantas sintomáticas. A infecção cruzada por isolados do biótipo-C foi caracterizada em MT, mutantes hormonais e transgênicos, contudo não foi possível observar sintomas em nenhum genótipo. A interação entre *M. perniciosa* do biótipo-S e -C e MT foi avaliada por expressão de genes envolvidos na resposta de defesa da planta por RT-qPCR. Após a inoculação com o biótipo-S, o maior número desses genes apresentou acúmulo de transcritos 48 h após a inoculação, seguido do momento a 120 h. Em contrapartida, nas inoculações com o biótipo-C, a indução dos genes deu-se no período de 48 h, porém a resposta atingiu os maiores níveis de expressão 72 h após a inoculação. Mutantes hormonais (*jasmonic acid insensitive 1* e *curl3*) e plantas transgênicas (*prosistemina* e *NahG*) também foram avaliados para expressão de genes ligados a resposta de defesa das plantas por RT-qPCR. Os dois genótipos transgênicos que se mostraram menos susceptíveis, demonstraram a expressão de um inibidor de proteinase sinalizado pela via de JA, corroborando a hipótese que a redução no número de plantas com infecção por *M. perniciosa* esteja ligada a ativação da via do ácido jasmônico.

Palavras-chave: *Moniliophthora perniciosa*. Micro-Tom. Hormônios vegetais. Vassoura-de-bruxa. Interação planta-patógeno.

ABSTRACT

DEGANELLO, J. **Evaluation of the contribution of plant hormones in the interaction *Moniliophthora perniciosa* x *Solanum lycopersicum***. 2012. 118 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

Witches' broom disease is a major disease of cacao (*Theobroma cacao*), caused by the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, characterized by symptoms, such as tissue swelling and induction of lateral buds in infected branches. Cacao resistance mechanisms against *M. perniciosa* remain unknown, and the long lifecycle of such species impairs the study of the interaction. *Moniliophthora perniciosa* S-biotype- isolates infect tomato (*Solanum lycopersicum*), and the miniature cultivar 'Micro-Tom' (MT) is a potential genetic model for the study of plant and pathogen interaction. Evaluation of this model started with the characterization of symptoms in MT plants inoculated with S-biotype isolates. Symptoms evaluated were stem swelling and the development of lateral broom. Through histological characterization of the interaction by scanning electron microscopy, it was possible to observe the preferential germination of basidiospores in the base of trichomes, with penetration points through wounds or directly through the epidermis. Increase in cellular volume in infected tissues was observed by light microscopy, and the colonization of the intercellular region by the fungus was detected through transmission electron microscopy, with the formation of an extracellular matrix involving the hypha. The contribution of plant hormones during pathogenesis was evaluated through the use of mutants and transgenic plants on the 'Micro-Tom' background with alterations in hormonal biosynthetic pathways or perception/signaling. The hormonal classes and genotypes evaluated were for brassinosteroids (*curl3*), auxin (*diageotropica*), ethylene (*epinastic* and *Never ripe*), abscisic acid (*notabilis*); gibberellin (*procera*); jasmonic acid (*jasmonic acid insensitive 1e prosistemina*); cytokinins (*CKX2*) and silicic acid (*NahG*). The genotypes *epinastic*, *notabilis*, *procera* e *jasmonic acid insensitive 1* behaved as being more susceptible to *M. perniciosa* infection when compared to MT, while the remaining mutants were less susceptible, suggesting that the reduction in susceptibility to *M. perniciosa* might be related to the increase in jasmonate levels (JA), in the opposite to the levels of salicylate, which seems to increase together with the increase of symptomatic plants. Cross infection with biotype-C isolates was characterized in MT, hormonal mutants and transgenic plants, however typical symptoms of the disease were not observed in any of the genotypes inoculated. Genes involved in plant response and defense were evaluated for expression levels by RT-qPCR in the interaction between *M. perniciosa* S-and C-biotype with MT. After inoculation with S-biotype, the largest number of genes were up-regulated 48 h after inoculation, followed by a peak at the 120 h sampling. On the other hand, for C-biotype inoculation, gene induction started 48 h after inoculation, but the largest number of transcripts was detected after 72 hours. Hormonal mutants (*jasmonic acid insensitive 1* and *curl3*) and transgenic plants (*prosistemina* and *NahG*) were also assessed for expression levels of genes related to plant response and defense. Both transgenic genotypes which behaved less susceptible to the disease showed up-regulation of a proteinase inhibitor typically signaled by JA pathway, corroborating the hypothesis that the reduction of the number of plants infected by *M. perniciosa* may be related to the jasmonic acid pathway.

Keywords: *Moniliophthora perniciosa*. Micro-Tom. Plant hormones. Witches' broom. Plant-pathogen interaction.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Mecanismos de resposta de defesa das plantas contra patógenos	16
2.1.1 Fitohormônios e a resposta de defesa das plantas	18
2.2 O patossistema <i>Theobroma cacao</i> x <i>Moniliophthora perniciosa</i>	24
2.2.1 Mecanismos de defesa e hormônios vegetais na doença vassoura-de-bruxa	27
2.3 ‘Micro-Tom’ como modelo genético para doença vassoura-de-bruxa	29
3. OBJETIVOS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Material Vegetal	32
4.2 Isolados de <i>M. perniciosa</i> e produção de basidiósporos	33
4.2.1 Preparo das mudas, inoculação e avaliação de sintomas	33
4.3 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em plantas de tomateiro inoculadas	34
4.4 Análise de Microscopia Óptica (MO) em plantas de tomateiro inoculadas	35
4.4.1 Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) em plantas de tomateiro inoculadas	36
4.5 Desenho de iniciadores para plantas de tomateiro	36
4.6 Tratamento do material para extração de RNA	38
4.6.1 Extração de RNA total de tomateiro	39
4.6.2 Quantificação e análise da integridade do RNA total	39
4.6.3 Tratamento com DNase	40
4.6.4 Síntese de cDNA	40
4.6.5 Confirmação da eficiência da síntese de cDNA	41
4.7 Determinação da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)	41
4.7.1 Seleção dos genes referência	42
4.7.2 Detecção de transcritos de <i>M. perniciosa</i> nas plantas inoculadas	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Caracterização sintomatológica da interação de <i>M. perniciosa</i> do biótipo-S e ‘Micro-Tom’	44

5.2 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas com <i>M. perniciosa</i> do biótipo-S.....	49
5.3 Análise por Microscopia Óptica (MO) de plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas com <i>M. perniciosa</i> do biótipo-S.....	52
5.3.1 Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas com <i>M. perniciosa</i> do biótipo-S.....	53
5.4 Caracterização sintomatológica da interação de <i>M. perniciosa</i> do biótipo-S com mutantes hormonais e plantas transgênicas de tomateiro	55
5.5 Caracterização sintomatológica da interação de <i>M. perniciosa</i> do biótipo-C e ‘Micro-Tom’	70
5.6 Avaliação da interação de <i>M. perniciosa</i> do biótipo-C com mutantes hormonais e plantas transgênicas de ‘Micro-Tom’	73
5.7 Genes referência para análises de expressão gênica em ‘Micro-Tom’, mutantes hormonais e plantas transgênicas.....	78
5.8 Determinação da eficiência dos iniciadores específicos dos genes alvos para ‘Micro-Tom’, mutantes hormonais e plantas transgênicas	80
5.9 Detecção de transcritos de <i>RpL35</i> do fungo <i>M. perniciosa</i> biótipo-S e C em plantas de tomateiro inoculadas	81
5.10 Caracterização da expressão gênica da interação entre <i>M. perniciosa</i> do biótipo-S e ‘Micro-Tom’	85
5.11 Caracterização da expressão gênica da interação entre <i>M. perniciosa</i> do biótipo-C e ‘Micro-Tom’	91
5.12 Caracterização da expressão gênica da infecção por isolados do biótipo-S em <i>curl3</i> , <i>jai1</i> , <i>prosistemia</i> e <i>NahG</i>	94
6. CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS	101

1. INTRODUÇÃO

A vassoura-de-bruxa, causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005) [syn. *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer; Marasmiaceae] é a principal enfermidade que afeta o cacauieiro (*Theobroma cacao*), restrita a América do Sul e Caribe (PURDY; SCHMIDT, 1996). A doença é endêmica da região Amazônica e a sua introdução em regiões produtoras de cacau provocou o colapso das lavouras, tendo ocorrido mais recentemente no sul da Bahia (ANDEBRHAN et al., 1999) transformando o Brasil, um país tipicamente exportador, em importador de cacau.

A infecção em cacauieiro pelo fungo hemibiotrófico *M. perniciosa*, que apresenta fase parasítica e fase saprofítica, ocorre por meio da penetração dos tubos germinativos originado dos basidiósporos, em tecidos meristemáticos, ou seja, lançamentos foliares novos, almofadas florais e frutos em desenvolvimento (PURDY; SCHMIDT, 1996). Quando a infecção se mostra efetiva, as plantas apresentam sintomas de inchamento e excesso de brotações em ramos novos ('vassouras verde'), desenvolvimento de flores anormais e frutos partenocárpicos, além de surgimento de manchas necróticas em frutos em desenvolvimento (PURDY; SCHMIDT, 1996). O ciclo da doença completa-se quando as vassouras necrosadas e frutos infectados produzem os basidiocarpos que liberam esporos na atmosfera, aptos a causar infecção em outras plantas de *T. cacao* (PURDY; SCHMIDT, 1996). O controle da vassoura-de-bruxa pauta-se na poda fitossanitária, controle químico e biológico, e principalmente na resistência genética (LEAL JUNIOR, 2006). Programas de melhoramento de cacauieiros já demonstraram resultados significativos, produzindo clones com diferentes graus de resistência à doença e alta produtividade. Porém, quando se considera a variabilidade do patógeno e o número restrito de acessos com características de resistência, faz-se necessário a obtenção de novas fontes de resistência ao *M. perniciosa*, sendo esta uma das prioridades dos programas de melhoramento conduzidos pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) do Ministério da Agricultura e Pecuária (LEAL JUNIOR, 2006). Diante desses entraves atribuídos no melhoramento, a elaboração de novas estratégias de controle por meio de estudos moleculares mostra-se uma alternativa promissora para o manejo da doença vassoura-de-bruxa, sendo o estudo da interação entre *T. cacao* e *M. perniciosa* alvo de projetos de pesquisa que propõe elucidar a biologia do fungo e os diversos mecanismos de defesa acionados pela planta frente o ataque do patógeno.

Hormônios vegetais desempenham papel crucial na sinalização da resposta de defesa em plantas quando desafiadas por patógenos, sendo que o ácido salicílico (AS), etileno (ET) e ácidos jasmônico (JA) demonstram uma maior importância no mecanismo de interação planta-patógeno (ROBERT-SEILANIANZ; GRANT; JONES, 2011). Nesse contexto, a resistência do tipo ‘gene-a-gene’, proposto por Flor (1971), se manifesta contra patógenos biotróficos, com a resposta de resistência caracterizada pela morte celular localizada no ponto de infecção, denominadas de resposta de hipersensibilidade (HR), aliada a ativação da resposta imune sistêmica mediada pelo hormônio vegetal ácido salicílico, sendo o sinal móvel o metil salicilato (GLAZEBROOK, 2005; SMITH; DE MORAES; MESCHER, 2009; PARK et al., 2007). Nas avaliações de resistência de *T. cacao* a *M. perniciosa* não foi observada a resposta de hipersensibilidade, tanto para o genótipo resistente ‘Scavina 6’ e seus derivados, quanto para as novas fontes recentemente descritas ‘CAB 214’ ou ‘CAB 208’ (LEAL JUNIOR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007; SILVA; MATSUOKA, 1999). O mecanismo de resistência observado em cacauero contra *M. perniciosa* parece ocorrer nas primeiras 48 h após a inoculação e se caracteriza pela contenção do crescimento micelial no material resistente, com a redução da colonização e a consequente ausência ou atenuação dos sintomas da doença (LEAL JUNIOR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007; SILVA; MATSUOKA, 1999). Esse tipo de resposta de defesa tipicamente tende a ser caracterizada como a resposta regulada pelo jasmonato e/ou etileno, que tem como função restringir a colonização de tecidos infectados pelo patógeno, com a atenuação dos sintomas manifestados (VIJAYAN et al., 1998; FEYS; PARKER, 2000; POZO; VAN LOON; PIETERSE, 2005; BROEKAERT et al., 2006; BARI; JONES, 2009). A modulação da resposta à infecção por jasmonato e/ou etileno também está associada à indução e produção da proteína relacionada à patogênese (PR), tais como osmotina e enzimas líticas de parede celular; defensina; tionina; inibidores de proteinase; enzimas da síntese de fitoalexinas; e de algumas proteínas de reserva com atividade antifúngica (DEVOTO; TURNER, 2005; LORENZO; SOLANO, 2005; XU et al., 1994; PAUWELS; INZE; GOOSSENS, 2009).

O hormônio vegetal jasmonato igualmente regula a resposta de plantas a estímulos menos específicos, como a injúria e herbivoria (LI; LI; HOWE, 2001; 2002; BARI; JONES, 2009), e também poderia estar associado aos mecanismos envolvidos com o tipo de resistência mais ampla a não-patógenos, denominada de resistência *non-host* (ZIMMERLI et al., 2004). A resistência *non-host* geralmente não apresenta sinais visuais quando manifestada, e está associada a mecanismos pré-formados e com produção de compostos secundários, e em alguns casos, é possível ocorrer resposta de hipersensibilidade (MYSORE;

RYU, 2004; LIPKA; FUCHS; LIPKA, 2008). A resistência *non-host* pode ser caracterizada por uma sequência de obstáculos impostos aos não-patógenos, que pode ter como função evitar a diferenciação do patógeno, antes da penetração, por sinais emitidos pela planta; ou evitar a invasão por reforço de barreiras pré-formadas e barreiras “ancestrais induzidas”; ou restringir a interação e aquisição de nutrientes do hospedeiro; ou promover eventos de reconhecimento de sistemas de vigilância robustos independentes de interações ‘gene-a-gene’ do tipo R/Avr (LIPKA; FUCHS; LIPKA, 2008). Portanto, a resistência *non-host* envolve reconhecimento parcial dos microorganismos não-patogênicos que ativam mecanismos de proteção similares aos ativados por estresses abióticos ou bióticos (REIGNAULT; SANCHOLLE, 2005).

Para o estudo de eventos controlados por hormônios vegetais, o uso de genótipos contrastantes, tais como mutantes, plantas transgênicas e variação genética natural, tem se mostrado bastante vantajoso (KLEE; ESTELLE, 1991; KOORNNEEF; ALONSO-BLANCO; PEETERS, 1997; MCCOURT, 1999). Embora esse tipo de estudo em *T. cacao* seja dificultado ou inviabilizado pelas características biológicas dessa espécie de planta, o patossistema *M. pernicioso*, dispondo de isolados do biótipo-S permite a utilização do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. Syn. *Lycopersicon esculentum* Mill.), em especial a cultivar ‘Micro-Tom’ (MT), como modelo de estudo. MT é uma cultivar miniatura de tomateiro, criada com o propósito de ser usado como planta ornamental, mas seu porte reduzido (8 cm de altura) e ciclo de vida curto permitiu o uso dessa cultivar como um novo modelo genético, semelhante ao que se tem hoje para a *Arabidopsis thaliana* (MEISSNER et al., 1997).

No presente estudo foi caracterizada a interação de *M. pernicioso* do biótipo-S e biótipo-C em ‘Micro-Tom’, e identificado o papel dos fitohormônios por meio do uso de mutantes hormonais e plantas transgênicas em inoculações com ambos os biótipos. Além disso, o padrão de expressão quantitativa de genes relacionados à defesa da planta e hormônios vegetais foi avaliado durante a interação entre *M. pernicioso* e plantas de MT, mutantes hormonais e plantas transgênicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Mecanismos de resposta de defesa das plantas contra patógenos

As plantas estão sujeitas ao ataque de diversos tipos de patógenos, e em resposta, expressam mecanismos de defesa que quando acionados percebem a agressão, traduzindo essa percepção em uma resposta adequada e de forma adaptativa (DANGL; JONES, 2001). A defesa da planta ao ataque do invasor, de maneira geral é efetiva, visto a multiplicidade desses mecanismos, de modo que na natureza a resistência é uma regra e a susceptibilidade uma exceção (AGRIOS, 1997).

O modelo proposto por Jones e Dangl (2006) descreve o sistema imune das plantas em forma de ‘zig-zag’, no qual em um primeiro momento da infecção do hospedeiro existe o reconhecimento, por parte do sistema imune basal de diversas moléculas conservadas em uma vasta gama de patógenos. Essa detecção pauta-se no reconhecimento dos chamados padrões moleculares associados a patógenos, os *PAMPs* (*pathogen associated molecular pattern*) ou *MAMPs* (*microbe-associated molecular pattern*), os quais estão diretamente relacionados a processos biológicos básicos do patógeno, podendo ser lipossacarídeos, quitinasas fúngicas, flagelinas bacterianas, entre outros (ZIPFEL; FELIX, 2005). Desse modo, receptores de reconhecimento padrão (PRRs, *pattern recognition receptors*) com regiões repetidas ricas em leucina (LRR) presentes na membrana plasmática do hospedeiro, reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos, estimulando cascatas de sinalizações que envolvem fluxos de Ca^{+2} no citoplasma, cascata de MAP quinases (MAPKs, proteínas quinases ativadas por mitógenos), produção de espécies ativas de oxigênio (ROX) e óxido nítrico, resultando em diversas respostas, incluindo deposição de calose para reforçar a parede celular, fechamento dos estômatos, indução de genes relacionados à defesa e síntese de compostos antimicrobianos como as PR (proteínas relacionadas à patogênese) (VAN LOON, 1999; RESENDE et al., 2007; GÖHRE; ROBATZEK, 2008). Esse mecanismo de reconhecimento dos *PAMPs/MAMPs* e sua respectiva resposta de defesa são denominados PTI (PTI, *PAMP-triggered immunity*). Se o patógeno não conseguir transpor essa barreira imposta pela planta, a PTI é desligada, a colonização do patógeno na região apoplástica é interrompida e a infecção não se instala (JONES; DANGL, 2006).

No entanto a pressão de seleção imposta pelos mecanismos de resistência favorece fitopatógenos que possuem estratégias fundamentais para seu sucesso evolutivo, burlando as defesas da planta para estabelecer a infecção, garantindo a colonização do hospedeiro (JONES; DANGL, 2006). Sendo assim, no intuito de suprimir a resposta do tipo PTI, o patógeno pode liberar os chamados efetores ou proteínas eliciadoras, codificadas pelos genes de avirulência *avr*, os quais interagem com moléculas-alvo, que podem ser extracelulares e/ou receptores de superfície, ou intracelulares. Os efetores podem ser secretados e translocados para dentro das células da planta através de estruturas especializadas, como vesículas ou haustórios (KAMOUN, 2006). Caso o patógeno seja bem sucedido, consegue desenvolver o processo infeccioso na planta promovendo um tipo de interação denominada ‘compatível’ (GOHRE; ROBATZEK, 2008). Porém, essas moléculas efetoras ou o produto de sua ação podem vir a ser reconhecidas num segundo momento por proteínas oriundas dos genes *R*, conforme descrito na teoria ‘gene-a-gene’ (FLOR, 1971). Quando o produto dos genes *R* e *avr* são complementares, a interação é dita ‘incompatível’, visto que a infecção não se desenvolve, o patógeno é reconhecido como avirulento e a planta resistente. Esse mecanismo de defesa mediada por efetores (ETI, *effector-triggered immunity*) possibilita uma resposta de defesa semelhante ao que se tem para PTI, como explosão oxidativa, fluxo de íons através da membrana e expressão de genes de defesa da planta ativados por cascata de sinalização. Entretanto, a resposta defesa ETI é qualitativamente mais forte e rápida, sendo considerada uma reativação da PTI de forma potencializada, e muitas vezes envolve o mecanismo de hipersensibilidade (HR), fazendo com que ocorra a morte celular programada (PCD) das células infectadas (principalmente para patógenos biotróficos) e o acúmulo local de compostos antimicrobianos, evitando que a doença se espalhe por toda a planta (JONES; DANGL, 2006; GOHR; ROBATZEK, 2008).

Após a ativação do sistema imune inato das plantas, tanto por PTI ou ETI, a sinalização necessária para desencadear os mecanismos de defesa são amplificados e coordenados por mensageiros secundários, usualmente hormônios, como ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (JA) ou etileno (ET), que culminam na ativação de fatores de transcrição de genes de defesa, e subsequentemente na resistência sistêmica adquirida (SAR) que tem AS como principal sinalizador, ou resistência sistêmica induzida (ISR), tendo JA/ET como sinalizadores (MYSORE; RYU, 2004).

2.1.1 Fitohormônios e a resposta de defesa das plantas

Assim como estímulos ambientais ligados a fatores abióticos, estresses bióticos, como o ataque de um fitopatógeno, são hábeis em desencadear respostas de defesa as quais são sinalizadas e coordenadas pelos diversos hormônios vegetais (O'DONNELL et al., 2003). A integração dessa complexa rede hormonal de forma ordenada permite a atuação dos fitohormônios em sinergia, como a sinalização conjunta de ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) (O'DONNELL et al., 1996), ou mesmo de formas antagonicas, como no caso do ácido salicílico (AS) e ácido jasmônico (JA) (PEÑA-CORTÉS et al., 1993), propiciando uma resposta das plantas apropriada ao estímulo inicial.

Os fitopatógenos são classificados quanto a sua forma de nutrição, podendo ser biotróficos, os quais obtêm nutrientes retirados exclusivamente de tecidos vivos do seu hospedeiro, ou necrotróficos, que conseguem nutrientes das células mortas. Patógenos denominados hemibiotróficos possuem formas de nutrição tanto biotrófica como necrotrófica, dependendo das condições em que se encontram ou estágio de vida (GLAZEBROOK, 2005). Em um primeiro momento, patógenos hemibiotróficos invadem os tecidos causando o mínimo de danos possíveis nas células vegetais, mantendo-as vivas e voltando o metabolismo da planta a seu favor, porém com o decorrer da infecção promovem a morte das células completando seu ciclo de vida (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000). Na regulação da resposta de defesa aos patógenos com diferentes estilos de vida, o ácido salicílico, etileno e ácido jasmônico são os hormônios que acumulam mais evidências sobre sua atuação nesse mecanismo. Estudos em *Arabidopsis thaliana* demonstram que o ácido salicílico estaria relacionado à sinalização da resposta de defesa contra patógenos biotróficos e hemibiotróficos; e o etileno e jasmonato à necrotróficos (GLAZEBROOK, 2005).

A sinalização regulada pelo fitohormônio ácido salicílico (AS) está envolvida na defesa local e na resistência sistêmica adquirida (SAR), conferindo resistência de longa duração contra um amplo espectro de agentes patogênicos. De forma rápida e localizada, a resposta de hipersensibilidade (HR) caracteriza-se pela morte de células vegetais no sítio de infecção e priva o patógeno de sua fonte de nutrientes nas interações com patógenos biotróficos (GLAZEBROOK, 2005). Esse tipo de reação relaciona-se ao aumento dos níveis de ácido salicílico, além de coincidir com altos níveis de transcritos de genes que codificam para as proteínas relacionadas à patogênese (PR). Essas proteínas podem ser ativadas por aplicação exógena de AS por meio de seu análogo funcional sintético benzotiadiazole (BTH),

possibilitando maior resistência a patógenos biotróficos (SCHAFFRATH; FREYDL; DUDLER, 1997). A importância do sistema de defesa da planta sinalizado por AS foi estudado através do desenvolvimento de plantas transgênicas expressando o gene bacteriano *nahG* de *Pseudomonas putida*. Esse gene codifica para enzima salicilato hidroxilase, que inativa AS através de sua conversão em catecol. Plantas transgênicas *NahG*, por não acumularem AS, foram incapazes de desenvolver a resposta de HR e consequentemente não expressaram genes que codificam para proteínas PR (GAFFNEY et al., 1993, DELANEY et al., 1994). As proteínas PR são expressas em diversas regiões das plantas, não se restringindo ao ponto de inoculação com o patógeno; desse modo tem-se a resposta do tipo SAR, a qual se correlaciona com o aumento na expressão de genes PR e consequentemente ao acúmulo de AS (DURRANT; DONG, 2004). No entanto, apesar do AS estar ligado à resistência a patógenos biotróficos em *Arabidopsis thaliana*, estudos em *Solanum scutellum* indicam que AS regula a resposta de resistência ao fungo necrotrófico *Botrytis cinerea*, enquanto em *Nicotiana tabacum* a resistência é regulada por etileno (GERAATS; BAKKER; VAN LOON, 2002; ACHUO et al., 2004), demonstrando que diferentes patossistemas também influenciam no desempenho da sinalização dos hormônios vegetais na interação com o patógeno.

No outro extremo da interação planta-patógeno, os fitohormônios jasmonato e etileno atuam na resposta de defesa a fungos necrotróficos (GLAZE BROOK, 2005). Patógenos necrotróficos se beneficiam da morte celular do hospedeiro, e por esse motivo a resistência não está ligada à resposta de HR. Nesse caso, os mecanismos de defesa são desencadeados por um conjunto de respostas ativadas pela sinalização por jasmonato (JA) e/ou etileno (ET), sendo essas vias consideradas antagonistas a do salicilato (GLAZE BROOK, 2005). Plantas infectadas por patógenos necrotróficos acumulam JA, ativando genes PR diferentes daqueles induzidos por AS (SCHENK et al., 2000; DE VOS et al., 2005). Têm-se como exemplo os genes *PDF1.2* e *b-CHI*, que codificam proteínas com atividades antifúngicas (LORENZO et al., 2003), além de inibidores de proteinase e enzimas de síntese de fitoalexinas (Chalcona sintase - CHS, fenilalanina amônia liase - PAL) (DEVOTO; TURNER, 2005). Jasmonato e etileno frequentemente mostram uma interação de sinergia na indução de certas defesas das plantas, tais como a regulação do gene efetor de defesa *PDF1.2* (THOMMA et al., 2001). Do mesmo modo, esse efeito sinérgico entre as vias tem sido atribuído à ativação concomitante de fatores de transcrição comuns, como os da superfamília *ERF1* ('ethylene response factor 1') em *Arabidopsis thaliana*. *ERF1* age abaixo da inserção entre as rotas do ET e JA, sugerindo que esse fator de transcrição é um elemento chave na integração de ambos os sinais

para a regulação de genes de defesa (LORENZO et al., 2003; PRÉ et al., 2008). O efeito sinérgico entre ET e JA também estaria ocorrendo na sinalização da resposta de defesa da interação entre plantas de cacauzeiros do acesso ‘CAB 214’ resistentes à doença vassoura-de-bruxa, visto que em análises de expressão gênica, genes ligados a biossíntese de JA e ET estariam sendo altamente induzidos (LITHOLDO JUNIOR, 2009). Ácido jasmônico também pode interagir com a via do ácido salicílico, através do gene *NPR1* (Não-expressor de proteínas de resistência) e seus fatores de transcrição *TGA1* e *TGA4* (PIETERSE; VAN LOON, 2004). A proteína transcrita por *NPR1* atua como regulador da resposta de SAR e síntese das proteínas PR-1, sendo que o fator de transcrição *WRKY70* também é requerido para expressão de PR-1 e parece estar associado a característica antagônica da relação entre AS e ET/JA. Sendo assim, para que haja o efeito antagônico entre AS e JA é necessário a atuação da proteína reguladora NPR1 (BALLARÉ, 2011). Contudo, trabalhos com tabaco (*Nicotiana tabacum*) e arábida demonstraram sinergia transiente com aumento na expressão de genes relacionados tanto com JA (defensina *PDF1.2*) e AS (*PR1a-b-glucuronidase*), quando ambos indutores foram aplicados em baixa concentração. Diante disso, nota-se que o efeito sinérgico ou antagônico entre AS e JA pode ser adaptado conforme a natureza dos diferentes patógenos e do seu modo de patogenicidade, além da concentração dos hormônios presentes no sistema (MUR et al., 2006).

Atuando de forma sinérgica com jasmonato, o etileno (ET) apresenta diversas funções fisiológicas nas plantas, podendo ser produzido nas respostas de defesas ocasionadas por estresses abióticos e bióticos. O desequilíbrio desse hormônio na planta pode acarretar no desenvolvimento de um grande número de sintomas, tais como o crescimento exagerado de raízes, abscisão foliar, clorose e epinastia. Apesar de indícios que ET não se relaciona diretamente com a sinalização da SAR (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997), resultados experimentais demonstram que esse hormônio vegetal é capaz de induzir à expressão de algumas proteínas PR (PR-2, PR-3, PR-4 e PR-12) (ADIE et al., 2007), além de reforçar a estrutura da parede celular e acumular proteínas ricas em hidroxiprolina (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997; JACOBS; DRY; ROBINSON, 1999). Plantas de tabaco transgênicas insensíveis ao etileno (*Tetr*) demonstraram maior suscetibilidade a patógenos necrotróficos, como *Botrytis cinerea* e *Cercospora nicotianae*, porém para os biotróficos *Oidium neolycopersici* e *Peronospora tabacina*, os sintomas foram similares ou menos severos que o controle não-transgênico (GERAATS et al., 2003).

Outras classes de fitohormônios como auxina, ácido abscísico, citocinina, brassinoesteróide e giberelina, interagem com as principais classes de hormônios (AS, JA e ET) e podem participar na atenuação ou intensificação das respostas de defesa contra patógenos. O hormônio auxina apresenta grande importância em aspectos ligados ao crescimento e desenvolvimento vegetal. Os níveis endógenos desse hormônio podem ser aumentados quando a planta é desafiada com patógenos, independente da natureza do agente infeccioso. Quando isso ocorre, os efeitos vegetais se manifestam no comprometimento da permeabilidade da membrana, assim como o aumento na síntese de enzimas e proteínas estruturais (AGRIOS, 1997). Perturbações nos níveis de auxina demonstram ser uma estratégia de virulência comum para diversos patógenos como *Alternaria*, *Fusarium*, *Plasmodiophora*, *Colletotrichum*, *Phymatotrichum*, *Lentinus*, e *Sclerotium* (TSAVKELOVA et al., 2006), que possuem capacidade de sintetizar moléculas análogas a esse hormônio (SPOEL; DONG, 2008). A auxina interage com a via de sinalização de ácido salicílico, na maior parte das vezes de forma antagônica. Altas concentrações de auxina correlacionam-se com aumento da susceptibilidade a patógenos biotróficos, afetando a biossíntese de AS que, por consequência, suprime a expressão dos genes *PR-1* (ROBERT-SEILANIANZ; GRANT; JONES, 2011). Na interação entre JA e auxina, as informações mostram-se conflitantes. Mutantes de auxina com perda de função em seu receptor demonstraram diminuição na concentração de JA, enquanto que reguladores de resposta a auxina, ARF8 e ARF6, promoveram a biossíntese de JA (NAGPAL et al., 2005; TABATA et al., 2010), indicando assim, resultados de interação positiva entre os hormônios em questão. Contudo, trabalhos de Rojo et al. (1998), demonstraram que tratamentos com auxina promoveram repressão na sinalização de JA.

O papel do fitohormônio ácido abscísico (ABA) é bem delineado em processos de desenvolvimento, como germinação de sementes e dormência, bem como a resistência a estresses abióticos. Contudo, nas interações planta-patógeno, o efeito positivo ou negativo desse hormônio varia conforme o estilo de vida do organismo invasor. De modo geral, ABA parece estar envolvido como regulador negativo na defesa das plantas contra diferentes patógenos biotróficos e necrotróficos. Como exemplo, mutantes de tomate deficientes em ácido abscísico apresentaram maior resistência à *Botrytis cinerea* (AUDENAERT; DEMEYER; HOFTE, 2002), *Pseudomonas syringae* (THALER; BOSTOCK, 2004), *Oidium neolycopersici* (ACHUO et al., 2004) e *Erwinia chrysanthemi* (ASSELBERGH et al., 2008). Esses resultados corroboram com a detecção do aumento da susceptibilidade de diferentes plantas a patógenos em tratamentos feitos com aplicação exógena de ABA, como em

arabidopsis a *Pseudomonas syringae* (DE TORRES-ZABALA et al., 2007), soja a *Phytophthora sojae* (MOHR; CAHILL, 2001) e arroz a *Magnaporthe grisea* (KOGA; DOHI; MORI, 2004). Contudo, ABA também pode funcionar como regulador positivo devido esse hormônio ativar o fechamento dos estômatos, funcionando como uma barreira que impede a entrada do patógeno na planta (MELOTTO et al., 2006). A importância de ABA no desenvolvimento de sintomas também foi observada em estudos com aplicação desse fitohormônio junto ao ácido giberélico, resultando na susceptibilidade de feijoeiros aos fungos causadores da ferrugem (LI; HEATH, 1990). A interação de ABA se dá também com o hormônio brassinoesteróide, de modo que uma grande proporção de genes são regulados por ambos fitohormônios (GODA et al., 2008), e que aplicações exógenas de ácido abscísico inibem a sinalização por brassinoesteróides (ZHANG; CAI; WANG, 2009).

O hormônio citocinina, muitas vezes é utilizado por fungos biotróficos na formação das chamadas ‘ilhas verdes’ que se desenvolvem em torno do sítio de infecção, retardando a senescência da folha, e também na formação de galhas (CHOI et al., 2011). Assume-se que a citocinina está relacionada à supressão da resposta de hipersensibilidade; contudo trabalhos recentes com mutantes e transgênicos de arabidopsis demonstraram que altos níveis de citocinina estão relacionados com o aumento da resistência a *Pseudomonas syringae*, aumentando a biossíntese de AS e a expressão de *PR-1*. Essa interação entre os dois hormônios (AS e CK) envolve *ARR2*, um fator de transcrição sinalizado por citocinina, e o fator de transcrição *TGA3*, sinalizado por AS. Citocinina consegue induzir *PR-1* com a interação de ambos os fatores de transcrição (*ARR2* e *TGA3*), demonstrando uma interação direta entre citocinina e ácido salicílico (CHOI et al., 2010).

Brassinoesteróide (BR) é uma classe de hormônio envolvida na regulação do crescimento, desenvolvimento e diversas respostas fisiológicas da planta, contudo pouco se sabe sobre seu papel na resposta aos estresses bióticos (BARI; JONES, 2009). Estudos demonstraram que aplicações exógenas desse fitohormônio são capazes de aumentar a resistência a diversos patógenos biotróficos assim como ativar os genes *PR*, contudo de forma independente à biossíntese de ácido salicílico (NAKASHITA et al., 2003). BR também demonstra afetar a expressão de genes envolvidos na defesa e na biossíntese de outros hormônios, como exemplo do gene ACC sintase, envolvido na biossíntese de etileno, e *OPR3* (*12-Oxophytodienoate reductase*) associado à biossíntese de jasmonato (YI et al., 1999; MUESSIG et al., 2006). Ainda em se tratando do envolvimento do hormônio brassinoesteróide com o ácido jasmônico, Campos e Peres (2012), sugerem que BR interage negativamente com a via de JA, de maneira que redução nos níveis endógenos de

brassinosteróide pode acarretar em um aumento nas respostas mediadas por jasmonato, realocando recursos do crescimento vegetal para respostas de defesa. Em tomateiro, essa realocação se dá com a diminuição nos níveis de BR por meio da produção de sistemina que compete com BR, pela ligação com o receptor SR160/BRI1 (CAMPOS; PERES, 2012).

O hormônio giberelina (GA) promove o crescimento das plantas por estimular a degradação de reguladores negativos de crescimento denominados DELLA. Navarro et al. (2008) demonstrou que as proteínas DELLA de *arabidopsis* controlam a resposta imune da planta, modulando as vias de regulação por AS e JA. Essas proteínas promovem resistência a necrotróficos ativando respostas mediadas por JA/ET e susceptibilidade a biotróficos, reprimindo respostas por AS (BARI; JONES, 2009). Sendo assim, visto que GA estimula degradação de DELLA, a presença desse hormônio promove a resistência a biotróficos e susceptibilidade à necrotróficos (BARI; JONES, 2009).

A regulação da resposta de defesa vegetal, além de ser sinalizada pelos hormônios produzidos pela própria planta, também pode ser manipulada pelos fitopatógenos, os quais possuem mecanismos aptos a converter essa rede regulatória em seu benefício, por meio da produção de hormônios ou compostos análogos, de modo a burlar o sistema de defesa do hospedeiro e facilitar a patogênese, atuando como efetor (BARI; JONES, 2009). Neste processo, patógenos podem ativar a via hormonal de resistência que é antagônica ao seu estilo de nutrição, desencadeando desequilíbrios na homeostase do hospedeiro, o qual pode vir apresentar grandes alterações no crescimento e na divisão celular (ROBERT-SEILANIANZ; GRANT; JONES, 2011). Alterações no balanço hormonal redirecionam as atividades do hospedeiro favorecendo o desenvolvimento do patógeno, caracterizando relações patogênicas mais evoluídas, como no caso de murchas vasculares, tumores, galhas, ferrugens, oídios e vassouras-de-bruxa. Infecções por *Agrobacterium tumefaciens* possuem sintomas característicos de um desbalanço de hormônios, com formação de galhas provenientes da produção de auxina e citocinina, após a transferência do T-DNA contendo genes de biossíntese para esses hormônios para o cromossomo da planta (JAMESON, 2000). Diversos fungos biotróficos também demonstraram produzir citocinina, como os casos de *Cladosporium fulvum*, *Blumeria graminis*, *Pyrenopeziza brassicae* e *Venturia inaequalis*, porém em fungos necrotróficos a produção desse hormônio não foi observada (MURPHY et al., 1997; WALTERS; MCROBERTS, 2006). A doença ‘bakanae’, também com sintomas relacionados a distúrbios nos níveis hormonais, ocorre com o fungo necrotrófico *Gibberella fujikuroi* que produz giberelinas em plantas de arroz infectadas, as quais se apresentam mais alongadas do que as plantas saudáveis (SUN; GLUBER, 2004). Algumas cepas do hemibiotrófico

Pseudomonas syringae produzem uma fitotoxina chamada coronatina (COR) que se assemelha estruturalmente com os derivados de JA. A coronatina é utilizada pelo patógeno com a finalidade de imitar a sinalização por JA na planta, inibindo assim a defesa mediada por AS, aproveitando-se do antagonismo entre as vias (KOORNNEEF; PIETERSE, 2008).

2.2 O patossistema *Theobroma cacao* x *Moniliophthora perniciosa*

O cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) pertence à família *Malvaceae sensu lato*, sendo essa árvore nativa da região amazônica e cultivada nas Américas do Sul e Central, Caribe, África e Ásia (DIAS, 2001). O Brasil sempre ocupou posição de destaque na cultura cacaueira, chegando a ser considerado o principal produtor das Américas em 1994 (PURDY; SCHIMIDT, 1996). Contudo, diversas doenças como vassoura-de-bruxa, podridão-parda, morte-descendente foram responsáveis por acarretar a diminuição da quantidade e qualidade das lavouras de cacau. Porém nesse contexto, a doença que mais se destaca como principal causadora na redução da produtividade das plantações de cacau brasileira é a vassoura-de-bruxa (DIAS, 2001).

O agente causal da doença vassoura-de-bruxa pertence à classe dos fungos basidiomicetos, sendo inicialmente nomeado como *Marasmius pernicius* (STAHEL, 1915), renomeado para *Crinipellis perniciosa* na revisão do gênero por Singer (1942) e mais recentemente reclassificado como *Moniliophthora perniciosa* (Marasmiaceae; AIME; PHILLIPS-MORA, 2005). Esse fungo é endêmico da Bacia Amazônica na região da América do Sul, onde provoca enormes prejuízos nessa área, além de comprometer a cacaucultura no Caribe e Panamá (PURDY; SCHIMIDT, 1996; ALBUQUERQUE et al., 2005).

O fungo *M. perniciosa* possui uma gama de hospedeiros que permite classificar os isolados em biótipos. Os isolados patogênicos classificados como biótipo-C atingem o cacaueiro e outras espécies dos gêneros *Theobroma* e *Herrania* (Sterculiaceae) (ANDERBRHAN et al., 1995). Já o biótipo-S infecta espécies invasoras do gênero *Solanum* induzindo sintomas característicos da doença, ocorrendo geralmente em áreas de florestas alteradas (BASTOS; EVANS, 1985). O biótipo-B foi identificado no urucum (*Bixa orellana*) cultivado próximo a plantações de cacaueiro (BASTOS; ANDEBHRAN, 1986). Por fim, o biótipo-L pode ser isolado de lianas e cipós, principalmente da família Bignoniaceae, colonizando tecidos vivos sem induzir sintomas (GRIFFITH; HEDGER, 1994). Algumas

evidências demonstram que o biótipo-B e o biótipo-C são idênticos (LANA, 2004) visto que o biótipo-C foi capaz de induzir sintomas característicos da vassoura-de-bruxa em *Bixa orellana* (BASTOS; ANDEBHRAN, 1986). Os biótipos-S e -C exibem homotalismo primário e causam sintomas característicos em seus hospedeiros, já o biótipo-L geralmente não causa sintomas da doença e apresenta-se heterotático, com estratégia de reprodução cruzada (GRIFFITH; HEDGER, 1994). Apesar da produção de sintomas entre os biótipos-S e -C em seus hospedeiros, o biótipo-S mostra uma maior semelhança genética com o biótipo-L do que com o biótipo-C, sugerindo que os dois biótipos homotáticos evoluíram separadamente, provavelmente a partir do biótipo-L (GRIFFITH, et al., 1994). Em contrapartida, trabalhos recentes relacionaram geneticamente os biótipos-S e -C, concluindo que os isolados de *M. perniciosa* que infecta solanáceas, pertence ao mesmo grupo filogenético de isolados que atacam *T. caco*, *T. grandiflorum*, *T. subincatum* e *Herrania* sp (MARELLI et al., 2009). Estudos similares, usando sequências ITS, também agruparam os biótipos-S e -C em um mesmo clado filogenético (DE ARRUDA et al., 2005), apoiando os relatos de que alguns isolados do biótipo-S induziram sintomas de hiperplasia em 10% de plantas de *T. cacao* inoculadas (LOPES; LUZ; BEZERRA, 2001).

O fungo *M. perniciosa* apresenta ciclo de vida hemibiotrófico, com a fase biotrófica (parasítica) e a necrotrófica (saprofítica), causando uma série de alterações de cunho morfológico, histológico e na fisiologia da planta, conforme o estágio de vida em que o patógeno se encontra (GRIFFITH; HEDGER, 1994). A infecção se inicia quando os basidiósporos do fungo, produzidos pelos basidiocarpos e únicas estruturas infectivas demonstradas, germinam sobre a cutícula ou na base dos tricomas (EVANS, 1979). Com a emissão dos tubos germinativos, as hifas são capazes de penetrarem diretamente nos tecidos meristemáticos, ou através de ferimentos e estômatos (EVANS, 1981). Nesse estágio inicial, as hifas se desenvolvem na região apoplástica das células, com micélio largo (5 a 8 µm) sem grampos de conexão e monocariótico (EVANS, 1978; GRIFFITH; HEDGER, 1994). A infecção causa desordem fisiológica e hormonal, culminando no superbrotamento com o crescimento hipertrófico das gemas infectadas, formando as chamadas vassouras (‘vassoura-verde’), sintoma característico da doença (ALBUQUERQUE et al., 2005). A infecção de frutos leva a produção de frutos partenocárpicos, que podem apresentar forma de ‘morango’ ou ‘cenoura’, ou mesmo tornarem-se inchados e deformados com sementes impróprias para o consumo, refletindo em prejuízos econômicos para o produtor (PURDY; SCHMIDT, 1996). Após o início da necrose dos ramos infectados, as vassouras verdes passam às chamadas vassouras secas (PURDY; SCHMIDT, 1996). Os mecanismos envolvidos na transição da fase

biotrófica para a necrotrófica ainda não são conhecidos, porém metabólitos do cacau como carboidratos específicos, parecem influenciar na manutenção ou mudança de fase do fungo. Um meio de cultura contendo glicerol não permite a dicarionização do micélio obtido a partir de basidiósporos, mostrando que o glicerol pode ser um componente chave na manutenção do fungo na fase biotrófica, mas que ainda não demonstrou ser infectivo (MEINHARDT et al., 2006). Adicionalmente, trabalhos de Kilaru e Hasenstein (2005) concluíram que a transição de fase do fungo está correlacionada com o acúmulo de nutrientes. Leal Junior et al. (2010) propôs que a mudança de fase da vassoura-de-bruxa ocorra antes mesmo da manifestação dos sintomas como morte dos tecidos vegetais, visto a expressão diferencial de genes distintos nas fases biotrófica e necrotrófica.

Após a colonização dos tecidos mortos do hospedeiro seguido de períodos alternados de seca e chuva, o micélio necrotrófico origina os basidiocarpos hábeis a produzir os basidiósporos que dará continuidade ao ciclo de infecção (FRIAS; PURDY; SCHMIDT, 1991).

O controle da vassoura-de-bruxa faz-se através de poda fitossanitária, com a remoção das partes infectadas das plantas, com aplicações de fungicidas periodicamente e por meio de fungos endofíticos ou saprofíticos que limitam a atividade do patógeno (MEJÍA et al., 2008). Contudo o método de maior eficiência e definitivo para o controle da doença causada pelo *M. pernicioso* é a utilização de variedades resistentes (PURDY; SCHMIDT, 1996).

A busca de variedades de *T. cacao* resistentes deu-se no vale Amazônico, em cacauzeiros silvestres. Dentre os materiais identificados, os clones ‘Scavina 6’ e ‘Scavina 12’ destacaram-se pela sua elevada resistência à vassoura-de-bruxa; porém devido suas características agronômicas inferiores não foram usados diretamente como clones, mas sim como genitores de combinações híbridas (BARTLEY, 1986). O desenvolvimento de alguns sintomas de infecção no ‘Scavina 6’ e ‘Scavina 12’ estimulou a busca por novas fontes de resistências geneticamente diferentes. No Brasil a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) realizou essas buscas em acessos de germoplasma da Amazônia brasileira, que foram mantidas na Estação de Recursos Genéticos José Haroldo (ERJOH) no Pará. A avaliação para a resistência à vassoura-de-bruxa nesses acessos destacou ‘CAB 214’ e ‘CAB 208’ (FONSECA; ALBUQUERQUE, 2000; LEAL JUNIOR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007; ALBUQUERQUE et al., 2010).

2.2.1 Mecanismos de defesa e hormônios vegetais na doença vassoura-de-bruxa

Mecanismos estruturais pré-formados, como características morfológicas das plantas, podem funcionar como barreiras à entrada do patógeno, como o caso dos clones ‘PA150’ e ‘Scavina 6’ que possuem baixa frequência estomática quando comparada a plantas de cacau susceptíveis a vassoura-de-bruxa (SENA-GOMES; ROCHA, 1995). Outro exemplo seria a alta densidade de tricomas sobre as gemas em materiais resistentes, que podem atrasar ou mesmo evitar a entrada do patógeno devido à dificuldade na deposição das estruturas infectivas do fungo (TOVAR, 1991). A presença de maiores teores de fenóis solúveis em tecidos foliares sadios de clones também está associado a algum nível de resistência a vassoura-de-bruxa, principalmente o ‘TSH 1188’ considerado resistente em condições de campo, sugerindo o envolvimento dos compostos fenólicos na resistência constitutiva do cacaueiro contra *M. perniciosa* (AGUILAR et al., 1999). Estudos histopatológicos demonstraram que a hiperplasia do córtex e no tecido vascular, e a hipertrofia no córtex e no floema secundário, ocorriam mais intensamente em clones susceptíveis a vassoura-de-bruxa. Já os genótipos tolerantes formavam uma barreira física contra a infecção, como resultado de maior atividade cambial com posterior necrose das células, limitando o desenvolvimento do fungo com provável participação de fitoalexinas fenólicas (LAKER; SREENIVASAN; KUMAR, 1991).

O mecanismo de resistência observado em plantas infectadas por *M. perniciosa* se pauta principalmente na contenção do crescimento dos micélios fúngicos, considerando que no material resistente a colonização dos tecidos seria menor do que em plantas susceptíveis à doença (SILVA; MATSUOKA, 1999). Corroborando com esses resultados, análises de RT-qPCR detectaram transcritos do fungo apenas em períodos iniciais subsequentes a inoculação (de 24 h a 72 h) nos materiais resistentes ‘CAB 214’ e ‘CAB 208’, enquanto que no susceptível ‘ICS 39’, a detecção do fungo foi possível em períodos posteriores, como 240 h após a inoculação (LEAL JUNIOR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007).

Componentes que contribuem para resistência das plantas à doença podem ser evidenciados através de estudos de expressão de genes envolvidos na resposta de defesa, indicando a forma de atuação desses genes. No caso do cacaueiro, genes associados à resistência e resposta de defesa contra a vassoura-de-bruxa foram identificados em bibliotecas através de folhas tratadas com eliciadores de resistência como o Benzothiadazole (BTH), etileno, metil jasmonato e NEP 1- elicitor protéico purificado de *Fusarium oxysporium*,

ocorrendo à ativação de genes regulados por jasmonato (VERICA et al., 2004). Nesse contexto, um dos resultados marcantes das bibliotecas de interação entre *T. cacao* com *M. pernicioso* foi a presença de genes que codificam a informação necessária para a síntese de proteínas do complexo de degradação de proteínas marcadas com ubiquitina, uma característica associada à resposta regulada por JA (LORENZO; SOLANO, 2005). Ainda associado à sinalizações mediadas por JA, bibliotecas subtrativas confrontando o genótipo susceptível 'ICS 39' com o resistente 'CAB 214' apresentaram genes diferencialmente expressos no cacaueiro principalmente para proteínas inibidoras de protease, enzima líticas da parede de fungo e enzimas do metabolismo secundário, em grande parte para o metabolismo de flavonóides, sendo alguns desses genes induzidos apenas pela via do hormônio JA (LEAL JUNIOR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007). Desse modo, as formas de resistência manifestada no cacaueiro em resposta à infecção junto com os dados dos genes identificados nas bibliotecas de interação e a expressão gênica sugerem que o mecanismo de resistência contra *M. pernicioso* estaria sendo regulado pelo hormônio vegetal JA e/ou ET.

Apesar não existir relatos de resposta de hipersensibilidade (HR) mediada por AS em *T. cacao* apresentando sintomas da vassoura-de-bruxa, respostas de HR foram observadas em cacaueiros inoculados com *M. pernicioso* com isolados de *Solanum stipulaceum*, ocorrendo a morte rápida e localizada das células hospedeiras vizinhas ao local de infecção (RESENDE; BEZERRA, 1996). Esse tipo de interação incompatível, normalmente é acompanhado pela síntese de fitoalexinas, sendo que esses compostos já foram detectados por cromatografia no genótipo resistente 'Scavina 6' posterior a inoculação de *M. pernicioso* (ANDRADE et al., 1999).

A estratégia com a qual o fungo *M. pernicioso* altera o balanço hormonal resultando nas más formações, observadas no desenvolvimento da planta doente, ainda são focos de estudo. Diversos trabalhos com o fungo *Moniliophthora pernicioso* apresentam evidências de que esse patógeno produza ao menos quatro tipos de hormônios. No genoma foram identificados genes envolvidos na síntese de ácido giberélico (MONDEGO et al., 2008), corroborando com trabalho proposto por Bastos e Andebrhan (1981), que identificou a produção desse hormônio nos basidiósporos. Genes relacionados a vias biossintéticas de ácido indol acético (IAA), classe de auxina mais abundante em plantas, também foram revelados no genoma do fungo em questão (MONDEGO et al., 2008), sendo esse hormônio responsável por induzir a xilogênese (formação de tecido do xilema), e a divisão celular, sendo essas uma das mudanças mais perceptíveis observadas durante a infecção do *M. pernicioso* (MARELLI et al., 2009). A produção de peroxidases e lacases pelo micélio de *M. pernicioso* em meio de

cultura promoveu a destruição de auxinas, podendo esses resultados demonstrarem grande significância na patogênese, pois a perda da dominância apical e proliferação das vassouras axilares sugerem modificações no balanço entre IAA e suas oxidases (KRUPASAGAR; SEQUEIRA, 1969). O fungo *M. perniciosa* também demonstrou aptidão na produção do hormônio AS em tecidos infectados (KILARU; BAILEY; HASENSTEIN, 2007; CHAVES; GIANFAGNA, 2006). Os níveis das principais citocininas (zeatina, zeatina ribosídeo, isopenteniladenina e isopenteniladenosina) também foram investigados em plantas infectadas com *M. perniciosa*, sendo que apenas a zeatina ribosídeo apresentou um aumento significativo, embora ainda em baixos níveis, nas plantas infectadas com o fungo (ORCHARD et al., 1994).

2.3 ‘Micro-Tom’ como modelo genético para doença vassoura-de-bruxa

O ‘Micro-Tom’ (MT) é uma cultivar miniatura de tomateiro, criada com o propósito de ser usado como planta ornamental (SCOTT; HARBAUGH, 1989). Contudo, seu porte reduzido com cerca de 8 cm de altura e ciclo de vida curto de aproximadamente 90 dias, com o amadurecimento dos frutos 75 dias após a semeadura, fizeram com que Meissner et al. (1997) propusessem que essa cultivar poderia ser usada como um novo modelo genético, semelhante ao que se tem hoje para a *Arabidopsis thaliana*. O ciclo curto de ‘Micro-Tom’ pode acelerar a criação de NILs (linhas quase isogênicas), uma vez que esse processo leva pelo menos seis gerações de retrocruzamentos (CARVALHO et al., 2011). O tomateiro possui diversas características de um modelo biológico, sendo plantas diplóides autógamas com genoma pequeno de 950 Mb distribuído em 12 cromossomos. Além disso, possui mapa de ligação com diversos marcadores associados a traços de importância econômica e biológica, genoma sequenciado e uma rica coleção de germoplasma (CAMPOS et al., 2010). Sendo assim, o MT mostra-se um aliado nos estudos de processos de desenvolvimento vegetal e mesmo nas interações planta e patógeno (ARIE et al., 2007) nos casos que as avaliações são difíceis ou impossíveis em *Arabidopsis*, como análise de características de frutos carnosos (CAMPOS et al., 2010).

Essa cultivar se ajusta a estudos genéticos e fisiológicos pela grande disponibilidade de mutantes naturais ou obtidos artificialmente por mutagênese química e física (MEISSNER et al., 1997) ou mesmo por inserção de DNA de elementos de transposição e de T-DNA

(MEISSNER et al., 2000, MATHEWS et al., 2003). Adicionalmente, o ‘Micro-Tom’ dispõe de sistema de cultivo *in vitro* e protocolo de transformação estabelecido (PINO et al., 2010). Além disso, uma ferramenta vantajosa é a coleção de mutantes que afetam o metabolismo e a sensibilidade hormonal, os quais são introgrididos na base genética de ‘Micro-Tom’ (CARVALHO et al., 2011) e podem ser utilizados em estudos genéticos e na compreensão das funções dos fitohormônios nas interações planta-patógeno, visto que várias mutações já foram relatadas. Alguns exemplos de mutantes hormonais de tomate são para auxina (HICKS; RAYLE; LOMAX, 1989), giberelina (KOORNNEEF et al., 1990), ácido abscísico (TAYLOR; BURBIDGE; THOMPSON, 2000), etileno (WIKINSON et al., 1995), e brassinoesteróides (KOKA et al., 2000).

Inoculações realizadas com diversos patógenos como *Botrytis cinerea*, *Oidium* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora infestans* apresentaram sintomas característicos nas plantas de ‘Micro-Tom’ desafiadas, demonstrando a possibilidade de estudos mais aprofundados na caracterização da interação patógeno-hospedeiro em diversas doenças de importância econômica, utilizando-se do modelo MT (ARIE et al., 2007).

A cultivar MT também pode ser usada no estudo da interação com o fungo *M. perniciosa*, visto a disponibilidade de isolados do biótipo-S que infectam o tomateiro (*Solanum lycopersicum*). A utilização de um modelo genético no estudo da doença vassoura-de-bruxa disponibiliza informações dos mecanismos de defesa do *T. cacao* a *M. perniciosa* em um menor tempo, sanando alguns entraves encontrados nas características biológicas do cacaueiro (MARELLI et al., 2009), como ciclo reprodutivo longo, espécie perene arbórea com baixa eficiência para o cultivo *in vitro* (FIGUEIRA; ALEMANNO, 2005).

3. OBJETIVOS

- Caracterizar o desenvolvimento sintomatológico da interação do biótipo-S e biótipo-C de *Moniliophthora perniciosa* com tomateiro (*S. lycopersicum* cv Micro-Tom).
- Caracterizar, por meio de observações histopatológicas, a germinação, penetração, alterações tissulares e colonização do fungo *M. perniciosa* do biótipo-S em ‘Micro-Tom’ por meio de microscopia óptica e eletrônica de transmissão e varredura.
- Avaliar redução ou amplificação dos sintomas nos mutantes e plantas transgênicas a fim de determinar o papel dos fitohormônios na interação *M. perniciosa* do biótipo-S e C e ‘Micro-Tom’.
- Investigar a expressão temporal de genes ligados a patogênese e hormônios vegetais em plantas de ‘Micro-Tom’ infectadas com o fungo *Moniliophthora perniciosa* do biótipo-S e -C.
- Investigar a expressão temporal de genes ligados a patogênese e hormônios vegetais em mutantes hormonais e plantas transgênicas infectadas com o fungo *Moniliophthora perniciosa* do biótipo-S.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, SP.

4.1 Material Vegetal

A cultivar ‘Micro-Tom’ (MT), mutantes hormonais (Tabela 1) e plantas transgênicas (Tabela 2) representando oito classes hormonais, foram utilizados para verificar a contribuição de cada hormônio isoladamente na manifestação dos sintomas da doença vassoura-de-bruxa. Todos mutantes hormonais e as linhas transgênicas estavam no mesmo *background* da cultivar MT (geração BC₆F_n). As plantas usadas nesse trabalho foram obtidas em projetos do laboratório do prof. Lázaro Peres da ESALQ/USP (FAPESP 2002/00329-8 e CNPq 476494/03-2).

Tabela 1- Mutações hormonais introgrididas na cv ‘Micro-Tom’ (MT) empregadas nesse trabalho. O mutante *jail* nos foi gentilmente cedido no *background* de MT pelo Prof. Gegg Howe (Michigan State University)

Mutantes	Classe*	Descrição/ função gênica
<i>diageotropica (dgt)</i>	AUX	Baixa sensibilidade. Defectivo para uma proteína ciclofilina (OH et al., 2006).
<i>Never ripe (Nr)</i>	ET	Baixa sensibilidade. Defectivo para um receptor de etileno (WIKINSON et al., 1995).
<i>epinastic (epi)</i>	ET	Alta produção de etileno. Função gênica desconhecida (FUJINO et al., 1988).
<i>notabilis (not)</i>	ABA	Baixos níveis de ABA. Defectivo para a enzima NCED (9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase) a qual cliva de carotenóides (BURBIDGE et al., 1999).
<i>procera (pro)</i>	GA	Supersensível a GA. Mutação para perda de função do domínio de repressão das proteínas DELLA (BESSEL; MULLEN; BEWLEY, 2008).
<i>curl3 (cu3)</i>	BR	Baixa sensibilidade. Gene defectivo para receptor de BR (<i>LeBRII</i>), homólogo ao <i>BRII</i> de <i>Arabidopsis</i> (MONTROYA et al., 2002).
<i>jasmonic acid insensitive 1 (jail)</i>	JA	Defectivo para <i>LeCOII</i> , uma componente da via de transdução de JA (LI et al., 2004).

* AUX = auxina; ET = etileno; ABA = ácido abscísico; GA = giberelina; BR = brassinoesteróide e JA = ácido jasmônico

Tabela 2- Plantas transgênicas de ‘Micro-Tom’. O transgênico *prosistemina* foi gentilmente cedido já em MT pelo Prof. Gegg Howe (*Michigan State University*) e o transgênico *NahG* por Dr. David Jones (*Australian National University*)

Transgênicos	Classe*	Descrição/ função gênica
<i>NahG</i>	AS	Baixos níveis de AS. Expressão do gene <i>nahG</i> que catalisa conversão de AS para catecol (BRADING et al., 2000)
<i>CKX2</i>	CK	Baixos níveis de CK. Superexpressão do gene <i>AtCKX2</i> (PINO et al., 2010).
<i>Prosistemina</i>	JA	Altos níveis de JA. Superexpressão de prosistemina, regulador positivo da via de sinalização de JA (MCGURL et al., 1994).

* AS = ácido salicílico; CK = citocinina; JA = ácido jasmônico

4.2 Isolados de *M. perniciosa* e produção de basidiósporos

Para produção de basidiósporos de *M. perniciosa* do biótipo-C e -S foram coletadas vassouras secas de ramos naturalmente infectados de cacauzeiros no sul da Bahia em Uruçuca (Fazenda Santa Maria) e de plantas de lobeira (*Solanum lycocarpum*) obtidas em Tiradentes, Minas Gerais. As vassouras foram expostas a ciclo alternado de umidade e seca (12 h) para induzir a formação de basidiocarpos. Os basidiocarpos produzidos foram então colhidos regularmente, tiveram seus estipes removidos e foram fixados pelo pôneo por gel de silicone na tampa de placas de Petri para liberação de basidiósporos sobre tampão de armazenamento (16% glicerol; 0,01 M MES, pH 6,1; 0,01% Tween 20). 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 ao microscópio óptico Axiovert 35 (Zeiss, Jena, Alemanha).

4.2.1 Preparo das mudas, inoculação e avaliação de sintomas

Sementes de ‘Micro-Tom’, mutantes hormonais (*dgt*, *not*, *epi*, *Nr*, *pro*, *cu3* e *jai1*) e plantas transgênicas (*CKX2*, *NahG* e *prosistemina*) foram germinadas em vasos de 250 mL contendo substrato PlantMax HT + vermiculita expandida (1:1) (detalhes em <http://www.esalq.usp.br/tomato/MMTCap2.pdf>). Após 14 dias da semeadura, as plântulas foram transplantadas para vasos de 150 mL com mesmo substrato. Dois dias após o

transplante, as plantas foram inoculadas, com auxílio de uma micropipeta. O volume de 60 µL da suspensão de basidiósporos na concentração de 10^5 foi aplicado nas regiões meristemáticas (meristema apical e gemas axilares das folhas) de cada planta, sendo em seguida mantidas em câmara úmida por 24 h montadas com garrafas PET 600 mL cortadas.

Nas inoculações realizadas com isolados dos biótipos-S ou -C para caracterização sintomatológica do ‘Micro-Tom’, mutantes hormonais e plantas transgênicas, os experimentos foram delineados de forma inteiramente casualizada e continham preferencialmente 30 plantas inoculadas e cinco plantas controle não-inoculadas. A avaliação do surgimento de sintomas teve início cinco dias após a inoculação, sendo realizada a cada cinco dias até os 35 dias posteriores a inoculação. As plantas foram avaliadas periodicamente em busca de parâmetros fisiológicos que caracterizassem a resposta da interação com o fungo *M. perniciosa*, incluindo o engrossamento da haste principal, que foi avaliado com o auxílio de um paquímetro, e o aparecimento de vassouras laterais. Nas análises histopatológicas realizadas em plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas com o biótipo-S, inicialmente, para microscopia eletrônica de varredura, em um total de 40 plantas inoculadas, foram coletadas aleatoriamente três plantas em cada período de avaliação (6, 12, 24, 48, 72 e 96 h), sendo o mesmo realizado para as plantas não inoculadas. As avaliações de microscopia óptica e eletrônica de transmissão contaram com um total de 50 plantas inoculadas, sendo que para cada período avaliado [48 h; 120 h; 240 h; 480 h (20 d); e 720 h (30 d) e 60 dias], foram coletadas três repetições biológicas para plantas inoculadas e controle.

4.3 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em plantas de tomateiro inoculadas

Amostras dos meristemas apicais de plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas ou não com o fungo *M. perniciosa* do biótipo-S foram coletadas nos períodos de 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação. De um total de 40 plantas inoculadas, foram coletadas três repetições biológicas para cada período avaliado, sendo que as plântulas remanescentes permaneceram em casa de vegetação até os 35 dias após a inoculação, funcionando como controle positivo da inoculação. Três repetições biológicas de plantas não-inoculadas também foram coletadas nos períodos previamente descritos. As amostras foram fixadas imediatamente após a coleta em solução Karnovsky (1965) modificado contendo 2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído,

5 mM cloreto de cálcio em tampão cacodilato de sódio (0,05 M pH 7,2). Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes, com duração de 10 min cada lavagem, em tampão 0,1 M cacodilato de sódio e pós-fixadas por 1 h com 1% tetróxido de ósmio em tampão 0,1 M cacodilato de sódio. Após rápidas lavagens com solução salina 0,9% foi feita a desidratação em séries crescentes de etanol em água nas seguintes concentrações 35%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% por 15 min em cada série, e 100% por três vezes de 20 min. Após esse procedimento, as amostras foram levadas ao aparelho de secagem ao ponto crítico (CPD/030 Baltec equipment, Liechtenstein) do NAP/MEPA ESALQ, montadas em ‘stubs’, e metalizadas com ouro durante 260 s ao evaporizador (SCD 050 Baltec equipment). As amostras foram observadas ao microscópio eletrônico Zeiss LEO 435 VP (Cambridge, Inglaterra), onde imagens digitalizadas foram obtidas.

4.4 Análise de Microscopia Óptica (MO) em plantas de tomateiro inoculadas

Amostras dos caules de ‘Micro-Tom’ inoculados e não-inoculados foram coletados nos períodos de 48 h, 120 h, 240 h, 480 h (20 d) e 720 h (30 d) e 60 dias após a inoculação com o fungo *M. perniciosa* do biótipo-S. As coletas foram feitas em três repetições biológicas para cada período avaliado, tanto para as plantas controle quanto para as inoculadas. Até o período de 240 h, as coletas se deram ao acaso visto que os sintomas não eram evidentes. Posteriormente, apenas as plantas sintomáticas foram coletadas para a análise. As plantas que não foram coletadas funcionaram como controle positivo da inoculação. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (1965) modificado, contendo 2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 5 mM cloreto de cálcio em tampão cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,2) durante 48 h, e lavadas em tampão 0,1 M cacodilato, e pós fixadas por 1 h com 1% tetróxido de ósmio em tampão 0,1 M cacodilato de sódio. Após rápidas lavagens com solução salina 0,9%, foram coradas “em bloco” com 2,5% acetato de uranila em água *overnight* e desidratadas em séries crescentes de acetona em água (25%, 50%, 75%) por cinco min, seguido por dois tratamentos de 10 min cada com acetona 90%, e três tratamentos de 20 min com acetona pura. A infiltração foi feita lentamente utilizando resina *Spurr* e acetona que se iniciou com relação volume/volume (v/v) 1:3 por 3 h; 1:1 por 16 h; e 2:1 por 48 h, e 24 h com resina pura, conforme recomendação do fabricante. A emblocagem foi feita em resina *Spurr* pura a 70°C por 48 h. Os cortes semifinos (90-120 nm), feitos em micrótomo (Leica RM2155

rotary microtome, Heidelberg, Alemanha), foram depositados sobre lâminas de vidro, e corados com 2% azul de toluidina em solução de 1% bórax durante 20 min a 45°C. O exame das lâminas foi feito ao microscópio óptico Microscópio Zeiss Axioscop2 (AxioPlan, Zeiss, Jena, Alemanha).e imagens digitalizadas foram obtidas.

4.4.1 Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) em plantas de tomateiro inoculadas

Após o exame das lâminas dos cortes semifinos (90-120 nm), as amostras que apresentaram uma maior concentração de hifas fúngicas nos tecidos das plantas foram selecionadas para confecção de secções ultrafinas (60-90 nm). Plantas com 60 d após a inoculação e hiperplasia pronunciada no caule demonstraram maior colonização nos tecidos com o fungo *M. perniciosa*, sendo utilizadas para os cortes ultrafinos, os quais foram feitos em ultramicrotomo Porter-Blum. Os cortes foram depositados em telas de cobre, contrastados com 2,5% acetato de uranila e citrato de chumbo, segundo Reynolds (1963). Após, foram observadas ao microscópio eletrônico Zeiss EM-900 (Monique; Alemanha) no NAP/MEPA-ESALQ-USP.

4.5 Desenho de iniciadores para plantas de tomateiro

Os iniciadores para genes referências (LOVDAL; LILLO, 2009, Tabela 3) e genes candidatos (BALAJI et al., 2008, Tabela 4) relacionados a resposta à patogênese e síntese ou percepção de hormônios vegetais foram desenhados utilizando o programa *Primer3* (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>) (ROZEN; SKALETSKY, 2000), designando-se a temperatura de dissociação (T_m) entre 59 e 61°C, sendo testados no programa *on-line NetPrimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>), em relação à estabilidade e eventual ocorrência de pareamento indesejável, como a formação de alças (*hairpins*), dímeros do mesmo iniciador (*primer dimers*) e entre o par de iniciadores (*cross dimers*). Esses iniciadores foram utilizados para o estudo de expressão gênica, sendo, para tanto, diluídos em água (Milli-Q) estéril, sendo diluído a 50 mM L⁻¹ para solução estoque e a 5 mM L⁻¹ para a solução de uso.

Tabela 3- Sequência dos iniciadores (*Foward* e *Reverse*) utilizados para amplificação dos genes de referência de tomateiro e seus respectivos número de acesso do GenBank (*tubulina*, *fator de elongação*, *PPA2acs* e *RPL2*) e do banco de dados DFCI TGI EST (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=tomato>) (*actina*, *GAPDH* e *ubiquitina*)

Gene	Iniciadores (5'-3')	GenBank e		
		DFCI	TGI	EST
<i>Actina (ACT)</i>	GAAATAGCATAAGATGGCAGACG ATACCCACCATCACACCAGTAT	TC219951		
<i>Beta tubulina (TUB)</i>	AACCTCCATTTCAGGAGATGTTT TCTGCTGTAGCATCCTGGTATT	DQ205342		
<i>Fator de elongação 1-alfa (EF1α)</i>	GGAACCTTGAGAAGGAGCCTAAG CAACACCAACAGCAACAGTCT	X14449		
<i>Proteína fosfatase 2A da subunidade catalítica (PPA2Acs)</i>	GTCATCCTTTCAGGTACAAGCA CGTTACAAACAACAGCTCCTTC	AY325817		
<i>proteína ribossomal L2 (RPL2)</i>	GTCATCCTTTCAGGTACAAGCA CGTTACAAACAACAGCTCCTTC	X64562		
<i>Ubiquitina (UBI)</i>	GGACGGACGTACTCTAGCTGAT AGCTTTTCGACCTCAAGGGTA	TC232697		
<i>Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)</i>	CTGCTCTCTCAGTAGCCAACAC CTTCCTCCAATAGCAGAGGTTT	TC1217630		

Tabela 4- Sequência dos iniciadores (*Foward* e *Reverse*) utilizados para amplificação dos genes alvo associados à resposta de defesa e biossíntese do hormônio jasmonato de tomateiro e seus respectivos número de acesso do GenBank

Gene	Iniciadores (5'-3')	GenBank
<i>Verticillium</i> wilt disease resistance protein (Ve1)	GTGGAGACAGGACGCAATCA CAGCTCCATGCCTTTGATG	AF272366
<i>EIX receptor 1</i> (EIX1)	TCTCCCACTTCTCTAGACTTGTCAC CAGCTAGACTTGTCATGTTTCATCC	AY359965
<i>Knotted-1</i> transcription factor (KNOX)	ACTATGTTGTTGGTCAAAGTCAAG ACGAACATGTTGTTGTAGTTGCTCT	AW032581
<i>Osmotin-like protein</i> (OSM)	AGGCCAAACATGGGTCATC CATGAACCTCTACCAGCACCA	AY093595
<i>Chitinase</i> (CHI)	GCTACCAGCAGAGTATTGACATGG GTGCACTCTCTACTGGCCTATTC	BG629612
<i>Chitinase, class 2</i> (CHI 2)	GGGAGTGCAATAGGTGTGAATC GTTGTGCTGTCATCCAGAACC	U30465
<i>Pti5, ERF/AP2</i> transcription factor (Pti5)	GAGAGTATGGCTAGGTACGTTTCG TAAGTAGTGCCTTAGCACCTCGC	U89256
<i>Peroxidase</i> (PEROX)	GTGCTCACACTATTGGAGTCTCTCT TTCGCTGTCTAGAGATGGATCTTG	AW647641
<i>Pathogenesis-related protein P4</i> (PR1a)	TATACTCAAGTAGTCTGGCGCAAC CCTACAGGATCGTAGTTGCAAGA	M69247
<i>Pathogenesis-related protein P6</i> (PR1b)	TATACTCAAGTAGTCTGGCGCAAC GCCTACAGGATCATAGTTGCAAGA	M69248
<i>Proteinase inhibitor II</i> protein (PIN-II2x)	TGATGCCAAGGCTTGTAAGTAGAGA AGCGGACTTCCTTCTGAACGT	AY247794
<i>Allene oxide cyclase</i> (AOC)	AATTAGCAACGGTGGCATGT CAGCGATTGGTGCTGATAGA	NM_001247090
<i>Wound-induced protease inhibitor II</i> (PIN2)	GCCAAGGCTTGTAAGTAGAGAATGT TACAACCCTTATAGCCTGAGCAAC	K03291
<i>12-Oxophytodienoate reductase</i> (OPR3)	CAAGTTTTGACCCAGCAGT CAACTGCGGATGCTATTGAA	NM_001246944

4.6 Tratamento do material para extração de RNA

Todo procedimento de extração de RNA foi realizado na bancada livre de ribonucleases, usando-se luvas de látex descartáveis, com utensílios exclusivos de manipulação de RNA. Pistilos, cadinhos e espátulas foram lavados com solução 0,01% SDS (p/v), e enxaguados com água, água destilada e água ultrapura (milli-Q). O material foi

incubado com água tratada com 0,01% dietilpirocarbonato (DEPC) ativo por duas horas na capela e secos, antes de serem embalados com papel alumínio, autoclavados a 120°C por 20 min e secos na estufa (80°C). Todas as soluções utilizadas na extração de RNA foram preparadas com água 0,01% DEPC inativa (autoclavada) e autoclavadas novamente.

4.6.1 Extração de RNA total de tomateiro

O RNA total foi extraído da região meristemática de plantas de ‘Micro-Tom’ inoculados com biótipo-S e C coletadas nos períodos de 48 h, 72 h, 120 h, 240 h, 480 h e 720 h, após inoculação, além de meristemas dos mutantes *cu3*, *jail* e transgênicos *NahG* e *prosistemina* inoculados com biótipo-S coletadas nos períodos de 48 h e 120 h pós-inoculação. RNA também foi extraído de plantas não-inoculadas (controle). Todas as extrações foram baseadas no protocolo do TRIzol (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante. Brevemente, 100 mg de tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e transferido para um tubo de centrífuga de 2 mL, onde foi adicionado 1 mL de TRIzol e vortexado. Após a homogeneização, foi feita uma incubação de cinco min a temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se uma centrifugação a 9000 g por 15 min a 4°C. Posteriormente a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, sendo adicionados 200 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após cinco min em temperatura ambiente, foi realizada uma nova centrifugação a 9000 g por 15 min a 4°C. Na fase superior transferida para um novo eppendorf, foram adicionados 500 µL de isopropanol, e a amostra foi novamente centrifugada. O *pellet* foi lavado três vezes com etanol 75% e centrifugado 9000 g por seis min a 4°C, e posteriormente ressuspendido em 20 µL de água DEPC.

4.6.2 Quantificação e análise da integridade do RNA total

Para conferir a integridade e a concentração do RNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel 1,2% agarose com tampão SB (10 mM NaOH pH 8,5; ajustado com ácido bórico) (BRODY; KERN, 2004) a 3 V cm⁻¹. Utilizando-se uma alíquota de 2 µL do RNA total, adicionados a 8 µL de tampão da amostra [50% de formamida; 1X MOPS (20 mM MOPS, pH 7,0; 50 mM acetato de sódio; 1 mM EDTA); 17,5% formaldeído;

0,4 mg mL⁻¹ brometo de etídeo, e 10X *loading buffer* (0,25% azul bromofenol; 0,25 % xileno cianol; 0,1 mM EDTA, pH 8; 50% glicerol)] as amostras foram aquecidas a 65°C por 10 min e colocadas no gelo imediatamente para a eliminação do efeito da estrutura secundária. Para determinação da concentração e pureza do RNA total extraído, uma alíquota de 1 µL de RNA foi submetida à leitura em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

4.6.3 Tratamento com DNase

Para digerir ácido desoxirribonucléico contaminante (DNA), 2 µg do RNA total de cada amostra foi tratado com DNAase I (Fermentas). A enzima foi utilizada na concentração de 1 Unidade/microlitro (U/µL) com 40 U de Ribolock RNase Inhibitor (Fermentas), 1X de tampão da DNAase e água (Milli-Q) estéril tratada com 0,01% DEPC, para completar um volume final da reação de 10 µL. A reação foi incubada no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) a 37°C por 30 min. Para que ocorresse a inativação da enzima, adicionou-se 2 µL de 25 mM EDTA, incubando a 65°C por 10 min, seguido de resfriamento a 4°C. Em seguida, a metade do volume do RNA total tratado foi utilizado para a síntese de cDNA.

4.6.4 Síntese de cDNA

O RNA tratado com DNase foi preparado para a síntese de cDNA, com adição de 1 µL de 50 µM *primer* poli-T (oligo-dT 18 pb); 1 µL de dNTP a 10 mM, seguida de incubação à 65°C por 5 min e resfriado à 4°C por 5 min. A transcrição reversa foi conduzida numa reação contendo tampão da enzima 5X *RT Buffer* (Fermentas), e 200 U de *RevertAid™ Premium Reverse* (Fermentas) e 20 U de Ribolock RNase Inhibitor (Fermentas) tendo como volume final da reação 20 µL. A reação de transcrição reversa foi incubada a 50°C por 30 min, 85°C por 5 min; e mantida a 4°C posteriormente. Depois de sintetizados, os cDNAs foram armazenados a -20°C.

4.6.5 Confirmação da eficiência da síntese de cDNA

A qualidade da síntese foi verificada por uma reação de RT-PCR, utilizando o par de iniciadores específicos para o gene tubulina com eficiência e especificidade previamente testadas. A reação seguiu os seguintes parâmetros: 1 µL de cDNA na concentração 10^{-1} ou 1 µL de RNA tratado com DNase I (controle negativo para presença de DNA na amostra), 1 U de *Taq* DNA Polimerase; 1X tampão de *Taq* DNA Polimerase; 2 mM $MgCl_2$; 200 µM de dNTP; 0,2 µM de cada iniciador e água ultrapura (Mili-Q) estéril, totalizando 25 µL de reação. As etapas de amplificação consistiram de desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 60 s; com extensão final à 72°C por 5 min. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de 1% agarose em tampão 1X SB. A cada uma das amostras foi adicionado um volume adequado de tampão de carregamento (0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol; e 15% ficol tipo 400-DL) contendo o corante *SYBR Gold* nucleic acid gel stain (Invitrogen).

4.7 Determinação da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

Os iniciadores específicos de *S. lycopersicum* para genes de referência (LOVDAL; LILLO, 2009, Tabela 3), genes relacionados à resposta de defesa (BALAJI et al., 2008; Tabela 4) e biossíntese de jasmonato, foram empregados para análise da expressão gênica nos cDNA obtidos de todas as amostras coletadas. As análises de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) foram realizadas em termociclador centrífugo Rotor-Gene Q (Qiagen) a partir de diluição 10^{-1} do cDNA total, derivado da transcrição reversa das amostras de RNA. As reações de amplificação foram realizadas no volume final de 10 µL utilizando-se 1 µL de cDNA; 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 30s, 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, previamente tratado com DNase. A aquisição dos dados em tempo real foi efetuada com o programa *Rotor-Gene Q Real-Time Analysis 6.0* (Qiagen). A eficiência de amplificação de cada par de iniciadores foi determinada pela curva de eficiência com três diluições seriadas do *pool* de cDNA das amostras de plantas de ‘Micro-Tom’, utilizados nas diluições 1:10; 1:100 e 1:100 ou 1:10; 1:20 e 1:40 (v/v).

A análise da curva de eficiência da diluição serial do *pool* de cDNA das amostras, além de determinar a eficiência dos *primers*, também serviu como referencial para se estabelecer o *threshold*. O coeficiente R^2 resultante foi considerado ideal com valores acima de 0,98; o valor de M (inclinação da reta) entre -3 e -4 foi considerado aceitável, sendo seu ótimo em torno de -3,6. A eficiência ideal deve ter valor igual a 1, o que corresponde a uma eficiência de amplificação = 2 (dobrando a cada ciclo), ou seja, 100%, no entanto, foi considerado satisfatório valores entre 80 e 100%.

4.7.1 Seleção dos genes referência

Com base na literatura, foram selecionados sete genes referência potencialmente ideais para a normalização da expressão gênica. Os genes estudados foram *actina*, *beta tubulina*, *fator de alongação 1-alfa (EF1 α)*, *proteína fosfatase 2A da subunidade catalítica (PPA2Acs)*, *proteína ribossomal L2 (RPL2)*, *ubiquitina* e *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)*. A estabilidade da expressão de cada gene foi calculada pelo software *GeNorm* (versão 3.5) (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) apresentando a média da estabilidade da expressão fornecendo um valor (M) e a variação na estabilidade dos melhores pares de genes (V), permitindo a exclusão gradual dos genes menos adequados, ou seja, com menor valor (M). Utilizando-se o programa *Relative Expression Software Tool 2009* (REST 09), de Pfaffl, Horgan e Dempfle (2002) (<http://rest.gene-quantification.info/>), os genes alvo foram normalizados a partir dos três melhores genes referência e a expressão e regulação gênica *up* e *down* foi calculada.

4.7.2 Detecção de transcritos de *M. pernicioso* nas plantas inoculadas

Para detectar transcritos do fungo *M. pernicioso* nas amostras inoculadas foram utilizadas as mesmas condições de amplificação previamente descritas. A análise pautou-se na curva de dissociação do produto amplificado pelo iniciador do gene da proteína ribossomal L35 (*RpL35*) específica de *M. pernicioso* (5' ACTTCGGGTGCAAAAGATTG 3'; 5' TGGTCCTTCTTCGTCTGCTT 3'), entre as temperaturas de 72°C e 95°C (curva de *melting*), tendo como referência a amplificação realizada com cDNA do fungo *M. pernicioso* cultivado *in vitro* (controle positivo). A detecção de transcritos foi realizada nos tempos de 48 h, 72h, 120 h, 240 h, 480h e 720 h, após a inoculação em 'Micro-Tom' com o biótipo-S e biótipo-C do fungo. Nos mutantes *cu3*, *jai1* e transgênicos *NahG* e *prosistemia*, os transcritos do fungo foram determinados no período de 48 h e 120 h após a inoculação com o biótipo-S.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização sintomatológica da interação de *M. perniciosa* do biótipo-S e ‘Micro-Tom’

Para propor o uso de ‘Micro-Tom’ como modelo no estudo da interação de *M. perniciosa* com hospedeiro, fez-se a caracterização do desenvolvimento de sintomas da doença desse tomateiro. Um lote de 30 plantas foi inoculado, restando cinco como controle. Cinco dias após a inoculação iniciou-se a avaliação das plantas para presença de sintomas, assim como a medição do engrossamento do caule com auxílio de um paquímetro. Essa avaliação foi realizada a cada cinco dias, até 35 dias após a inoculação com o patógeno.

Nas avaliações realizadas, 24 das 30 plantas de ‘Micro-Tom’ apresentaram com 35 dias sintomas de engrossamento, representando 80% das plantas inoculadas. Inicialmente foi possível observar com 10 dias após a inoculação brotações laterais pouco desenvolvidas (menor que 0,5 cm) que só foi possível confirmar como sintoma de vassoura aos 20 dias após a inoculação, quando estavam bem desenvolvidas (com mais de 4 cm). O número máximo de ‘vassouras verdes’ presentes nas plantas desafiadas com o fungo foram duas vassouras por planta. Os primeiros sintomas de engrossamento aconteceram aos 10 dias em 23 plantas, que com 35 dias atingiram um engrossamento médio de 1,22 cm, enquanto nas plantas controle o engrossamento médio foi de 0,67 cm, sendo a variação entre os diâmetros de 0,55 cm (Figura 1).

Figura 1 - Acompanhamento da média de diâmetro do caule de plantas inoculadas (linha vermelha) de ‘Micro-Tom’, a cada cinco dias após a inoculação com basidiósporos do biótipo-S, e de plantas não inoculadas, controle (linha azul)

Associado ao engrossamento do caule observou-se o engrossamento do pecíolo das folhas próximas ao local da inoculação, além de clorose e o não desenvolvimento da folha que estava em expansão no momento da inoculação (Figura 2). As folhas ficaram encarquilhadas, mas não foram observadas a formação de *blisters* descritas por Marelli et al. (2009). Pontos necróticos foram observados nos tecidos entre 20 e 30 dias sendo predominantes na região do engrossamento do caule; eventualmente observou-se necrose nas nervuras das folhas (Figura 3). Ainda neste período, evidenciou-se a morte dos meristemas das vassouras (Figura 3), porém as plantas infectadas e sintomáticas completaram o ciclo de vida produzindo frutos juntamente com as controle, sendo que a doença não acarretou a morte da planta. Para confirmar os resultados apresentados, o experimento de caracterização sintomatológica foi realizado novamente, demonstrando análises similares às obtidas no primeiro experimento.

Figura 2 - À direita, planta inoculada com folhas novas em expansão apresentando clorose (ponto branco). Os sintomas relatados não foram visualizados na planta controle (ponto vermelho)

Figura 3 - Fotos de plantas sintomáticas inoculadas com o fungo *M. perniciosa* do biótipo-S. A: Caule com engrossamento e necrose local; B: Pecíolo das folhas próximo ao local de inoculação com engrossamento (ponto preto) e pecíolo normal (ponto vermelho); C: Vassoura lateral com região meristemática morrendo; D: Folhas encarquilhadas com necrose nas nervuras. A, C e D: plantas com 30 dias após inoculação; B: planta com 10 dias após inoculação

Assim como em cacaueiro, onde a infecção do fungo acarreta em intumescimento de gemas infectadas e ramificação das gemas axilares formando as vassouras (PURDY; SCHMIDT, 1996), plantas de ‘Micro-Tom’ também apresentaram essas características no desenvolvimento da doença; contudo, diferentemente de *T. cacao*, as vassouras verdes do tomateiro não evoluíram para a formação das vassouras secas.

A cultivar ‘Micro-Tom’ possui alelos mutantes que podem influenciar no desenvolvimento, tais como *dwarf* (*d*), o qual reduz a biossíntese de brassinoesteróide sendo responsável pelo tamanho reduzido de MT e *self-pruning* (*sp*) responsável pelo crescimento determinado da planta (MARTÍ et al., 2006). Além disso, essa cultivar apresenta outros alelos adicionais como *uniform ripening* (*u*), que confere ausência de ombros verdes nos frutos, permitindo uma coloração mais uniforme nos tomates maduros, e os alelos *Sm* e *I* que promovem a resistência a *Stemphylium solani* e *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* (CAMPOS, et al., 2010). Para demonstrar que o desenvolvimento da doença vassoura-de-bruxa não foi influenciada pelas mutações presentes em MT, foram realizadas inoculações com a cultivar ‘MoneyMaker’ que não possui nenhuma mutação aparente, sendo amplamente usada em estudos genéticos com tomateiro. Das 30 plantas inoculadas da cultivar ‘MoneyMaker’, 22 tiveram sintomas da doença, representando 73,4% das plantas inoculadas. O espessamento médio da planta inoculada com o fungo foi de 1,41 cm contra 1,06 cm do controle, assim a variação entre os diâmetros foi de 0,35 cm (Figura 4).

Figura 4 - Acompanhamento da média de diâmetro do caule de plantas inoculadas (linha vermelha) de ‘MoneyMaker’, a cada cinco dias após a inoculação com basidiósporos do biótipo-S, e de plantas não inoculadas, controle (linha azul)

Assim como em ‘Micro-Tom’, as plantas inoculadas apresentaram vassouras laterais bem desenvolvidas e pronunciado engrossamento do caule quando comparadas com as plantas de ‘MoneyMaker’ não-inoculadas (Figura 5). No entanto, as plantas completaram seu ciclo de vida com produção de frutos saudáveis e não evoluíram para a formação de vassouras secas, sendo que infecção do fungo não foi capaz de causar morte das plantas. Dessa forma, pode-se evidenciar que o desenvolvimento dos sintomas da vassoura-de-bruxa em ‘MoneyMaker’ deu-se da mesma forma que na cultivar ‘Micro-Tom’, demonstrando que a interação do fungo *M. perniciosa* não foi influenciado por nenhum dos alelos mutantes presentes em MT.

Figura 5 - Fotos de plantas sintomáticas 30 dias após a inoculação com o fungo *M. perniciosa* do biótipo-S. A: Planta de ‘MoneyMaker’ não inoculada; B: Planta de ‘MoneyMaker’ inoculada com vassoura lateral; C: Caule da planta não-inoculada sem engrossamento; D: Caule da planta inoculada com engrossamento

5.2 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas com *M. perniciosa* do biótipo-S

Após a inoculação com isolado do fungo *Moniliophthora perniciosa* do biótipo-S, foram coletadas meristemas apicais das plântulas de ‘Micro-Tom’ nos períodos de 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas. As amostras foram observadas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) para determinar a germinação e penetração dos basidiósporos.

Seis horas após a inoculação, já foi possível visualizar a emissão de tubos germinativos vigorosos sem formação de apressório (Figura 6), havendo a germinação dos

basidiósporos sobre a cutícula e na base dos tricomas (Figura 7A). Em plantas coletadas 12 h após a inoculação, os basidiósporos germinados estavam dispersos sobre a epiderme do ‘Micro-Tom’ sem padrão determinado de colonização, não apresentando um crescimento preferencial em direção aos estômatos (Figura 7B). O mesmo foi observado para as amostras coletadas de 24 e 48 h após a inoculação (Figura 7C, 7D e 7E). No período de 96 h pós-inoculação, não foram mais observados basidiósporos germinados em nenhuma das amostras analisadas.

Apesar de trabalhos realizados por Frias et al. (1991) apresentarem penetração do tubo germinativo de *M. perniciosa* em estômatos de plantas de *T. cacao*, o mesmo não foi observado em plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas com o mesmo fungo, contudo de diferente biótipo. Observou-se penetração na base de tricomas 12 horas pós-inoculação (Figura 7F) e através de lesões na epiderme no período de 24 horas (Figura 7G). Além disso, 72 horas após a inoculação pôde-se observar uma possível penetração direta do fungo através da epiderme do meristema (Figura 7H). A ocorrência de penetração direta também foi descrita em trabalhos de Sreenivasan e Dabydeen (1989) sugerindo que a entrada das hifas diretamente pela epiderme, sem formação de apressório, se dê em decorrência da produção de substâncias através do tubo germinativo da hifa, que degradam o tecido do hospedeiro. Os tricomas mostraram-se pontos preferenciais de germinação e entrada do patógeno, visto que esses locais poderiam resultar em uma maior disponibilidade de nutrientes e uma cutícula de mais fácil penetração por estarem esticadas. A penetração preferencial pelos tricomas também foi observado em trabalhos de Kilaru e Hasenstein (2005) na inoculação de tecidos foliares de *T. cacao* com *M. perniciosa* do biótipo-C.

Figura 6 - MEV de meristema apical de ‘Micro-Tom’. A: Superfície epidérmica com tricomas glandulares (Tg) e não-glandulares (Tr) de ‘Micro-Tom’ não-inoculado. B: Superfície epidérmica de ‘Micro-Tom’ seis horas após inoculação com presença de basidiósporos (b) e tubos germinativos (t) do fungo *M. perniciosa*

Figura 7 -MEV de meristema apical de plântulas de MT inoculadas com *M. perniciosus* do biótipo-S. A: Basidiósporos (b) de *M. perniciosus* com emissão do tubo germinativo (t) na base de um tricoma não glandular (Tr) seis horas após inoculação; B: Basidiósporos (b) germinados sem crescimento preferencial do tubo germinativo (t) na direção aos estômatos 12 horas após inoculação; C-E: Basidiósporos de dispersos pela epiderme (e) e tricomas glandulares (Tg) e não glandulares (Tr), sem padrão determinado de colonização 24 e 48 horas após inoculação; F: Possível penetração(*) do fungo *M. perniciosus* na base do tricoma 12 horas após a inoculação; G: Penetração do fungo através de ferimento na epiderme 24 horas após a inoculação; H: Possível penetração do fungo diretamente pela epiderme após 72 horas da inoculação.

5.3 Análise por Microscopia Óptica (MO) de plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas com *M. pernicioso* do biótipo-S

Para caracterização histopatológica de plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas com o fungo *M. pernicioso*, amostras de plantas com 48 h, 120 h, 240 h, 480 h (20 d) e 720 h (30 d) e 60 dias após a inoculação e caules de plantas não-inoculadas foram fixados e preparados conforme a metodologia exposta para microscopia óptica. Por meio das análises microscópicas foi possível identificar em plantas infectadas com o fungo, hipertrofia nos tecidos com visível aumento do volume celular e crescimento desorganizado das células (Figura 8B). Em contrapartida, as plantas controle apresentaram uniformidade no padrão celular dos tecidos avaliados (Figura 8A).

Figura 8 - Secções semifinas de caule de ‘Micro-Tom’. A: Não-inoculado. Conformação normal das células; B: Inoculado com o fungo *M. pernicioso*. Desenvolvimento hipertrófico e desorganizado das células da planta. Epi= epiderme; ct= córtex; flo= floema; xil= xilema

Mudanças morfológicas nas células colonizadas com o fungo *M. pernicioso* em plantas de tomate foram descritas por Marelli et al. (2009). A área total do caule de plantas inoculadas foi significativamente maior do que as plantas controle, sugerindo que o aumento do diâmetro caulinar está diretamente ligado com o aumento da divisão celular (hiperplasia) (MARELLI et al., 2009). Contudo, trabalhos de Orchard et al. (1994) demonstraram que o espessamento dos tecidos infectados com o fungo *M. pernicioso* não se deu devido a um estímulo na divisão celular, mas no aumento do volume das células bem como no desenvolvimento desordenado dos tecidos.

A colonização dos tecidos com detecção de hifas foi visualizada em plantas infectadas somente a partir de 30 dias após a inoculação, porém ainda com número reduzido de hifas, sendo predominantemente intercelulares na região cortical (Figura 9B). Assim como em ‘Micro-Tom’, a colonização de tecidos infectados em *T. cacao* com o fungo sob microscópio de luz, também só foi visualizada 30 dias após inoculação, com baixa colonização do patógeno e com hifas apenas nas regiões intercelulares (SILVA, 1997).

Quando em contato com as células do hospedeiro, as hifas ocasionaram espessamento da parede, sendo ainda constatados vacúolos bem desenvolvidos no citoplasma hifal (Figura 9B).

Figura 9 - Secções semifinas de caule ‘Micro-Tom’. A: Caule de ‘Micro-Tom’ não inoculado, ausência de hifa; B: Hifa (indicada pela flecha) de *M. perniciosa* intercelular 30 dias após a inoculação, mostrando vacúolo no interior da hifa

5.3.1 Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas com *M. perniciosa* do biótipo-S

Ao microscópio eletrônico de transmissão, a colonização foi visualizada com 60 dias após a inoculação, com reduzido número de hifas de colonização unicamente intercelular. Os cortes ultrafinos foram feitos na região cortical do caule de MT, e as hifas observadas apresentaram conteúdo citoplasmático eletrodenso com vacúolos dispersos no mesmo (Figura 10). Envolvendo a hifa, detectou-se a presença de matriz extracelular (Figura 11), a qual pode estar relacionada ao armazenamento de nutrientes, estabelecimento e manutenção da fase biotrófica e impedimento ou supressão das defesas da planta (PERFECT et al., 1999). Nesse estágio de colonização intercelular, toda comunicação e troca de componentes entre

patógeno e hospedeiro ocorre no espaço apoplástico através da matriz fúngica, sendo essa uma característica de desenvolvimento em uma interação biotrófica (O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985).

Foi possível observar o aumento na espessura da parede celular do hospedeiro, e o achatamento da matriz extracelular hifal nos locais de contato (Figura 11), sugerindo que essa região funcione para troca de compostos necessários para sobrevivência do fungo. Esse tipo de nutrição é peculiar de fungos que não formam haustório, característica do *M. pernicioso*, assim como *Cladosporium fulvum*, patógeno biotrófico causador da cladosporiose em tomate (THOMMA et al., 2005). Embora a detecção das hifas do fungo *M. pernicioso* na análise de MET tenha ocorrido em plantas de 60 dias pós-inoculação, período em que possivelmente o fungo *M. pernicioso* estaria em sua fase necrotrófica (MARELLI et al., 2009), não foram identificadas hifas intracelulares caracterizando esse estágio no ciclo de vida do fungo.

Figura 10 - Secções ultrafinas (MET) do caule de plantas de 'Micro-Tom' inoculado com *M. pernicioso*. A e B: Colonização intercelular das hifas no córtex, aos 60 dias da inoculação

Figura 11 - Secções ultrafinas (MET) do caule de plantas de 'Micro-Tom' aos 60 dias da inoculação com *M. pernicioso*. Interação das hifas intercelulares com a parede do hospedeiro. A e B: junção da matriz hifal (ma) com a parede do hospedeiro (*)

5.4 Caracterização sintomatológica da interação de *M. perniciosa* do biótipo-S com mutantes hormonais e plantas transgênicas de tomateiro

Mutantes hormonais, plantas transgênicas e a cultivar ‘Micro-Tom’ foram inoculadas com isolados de *M. perniciosa* do biótipo-S para avaliar o papel de cada hormônio na interação entre o hospedeiro e o patógeno, incluindo infecção e desenvolvimento de sintomas. Foram avaliados genótipos referentes a oito classes hormonais, sendo representados por sete mutantes e três linhas transgênicas, todos introgrididos no *background* genético ‘Micro-Tom’. Os experimentos continham preferencialmente 30 plantas inoculadas e cinco controles não inoculados, sendo que as avaliações perduraram até 35 dias após a inoculação. Devido à grande variedade de genótipos, números de plantas e espaço disponível na casa de vegetação, os mutantes e transgênicos foram avaliados em experimentos distintos, mas sempre tendo o ‘Micro-Tom’ como controle do experimento. No primeiro experimento foram avaliados os mutantes *epinastic*, *procera*, e *notabilis*; no segundo os mutantes *Never ripe*, *curl3*, *diagiotropica* e a linha transgênica *CKX2*, no terceiro o mutante *jai1* e o transgênico *NahG* e no quarto experimento avaliou-se o transgênico *prosistemina*.

O primeiro experimento, com início em 08/12/2009 e término em 12/01/2010, foi realizado junto à caracterização sintomática da doença em MT e conforme relatado anteriormente, o ‘Micro-Tom’ apresentou 24 plantas infectadas entre as 30 inoculadas (80%) (Tabela 5), com diâmetro médio aos 35 dias após a inoculação de 1,22 cm contra 0,67 cm do controle, uma variação entre diâmetros de 0,55 cm (Figura 12). O mutante *epinastic* apresentou 12 plantas sintomáticas aos 10 dias, e no total teve 26 plantas doentes aos 35 dias (86,7%) (Tabela 5). O engrossamento médio do caule foi de 1,23 cm contra 0,73 do controle, uma variação entre diâmetros de 0,50 cm (Figura 12). O mutante *notabilis* apresentou 23 plantas com sintomas visíveis aos 10 dias, e aos 25 dias todas as plantas apresentavam sintomas (100%) (Tabela 5). O engrossamento médio do caule foi de 1,23 cm contra 0,56 do controle, uma variação entre diâmetros de 0,67 cm (Figura 12). No mutante *procera* foi possível observar 18 plantas com hiperplasia aos 10 dias, e aos 15 todas as plantas apresentavam sintomas de engrossamento do caule (100%) (Tabela 5). O engrossamento médio do caule foi de 1,28 cm contra 0,59 do controle, uma variação entre diâmetros de 0,69 cm (Figura 12). Na avaliação geral, todos os mutantes apresentaram sintomas (Figura 13). No entanto, avaliando o momento quando os sintomas aparecem, o número de

plantas doentes e o engrossamento do caule conjuntamente, foi possível determinar que alguns hormônios apresentaram participação relevante no desenvolvimento da doença.

Tabela 5 - Genótipos (MT, *epi*, *not* e *pro*) inoculados com basidiósporos do fungo *M. perniciosa* do biótipo-S, número e porcentagem de plantas sintomáticas

Genótipos	Nº plantas doentes	Porcentagem de plantas sintomáticas (%)
Micro-Tom (MT)	24	80%
<i>epinastic (epi)</i>	26	86,7%
<i>notabilis (not)</i>	30	100%
<i>procera (pro)</i>	30	100%

Figura 12 - Acompanhamento da média do diâmetro do caule de plantas inoculadas (linha vermelha) dos genótipos 'Micro-Tom', *epinastic*, *notabilis* e *procera* a cada cinco dias após a inoculação com basidiósporos do biótipo-S, e de plantas não inoculadas, controle (linha azul)

Figura 13 - Fotos de ‘Micro-Tom’ e mutantes hormonais (*epinastic*, *notabilis*, *procera*) no experimento de inoculação com basidiósporos de *M. perniciosa* do biótipo-S

A alta produção de etileno presente no *epinastic* parece aumentar o número de plantas sintomáticas e reduzir sutilmente os sintomas de hiperplasia. O papel do etileno na defesa das plantas pode refletir do seu envolvimento em vários processos fisiológicos vegetais, como o aumento na velocidade da senescência das folhas e do amadurecimento em frutos, podendo predispor os tecidos para o desenvolvimento de doenças causadas por patógenos necrotróficos (VAN LOON; GERAATS; LINTHORST, 2006). Plantas de tomate infectadas com o fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* apresentaram níveis significativamente maiores de etileno, e a aplicação desse hormônio ou seu precursor metionina em tecidos inoculados, acelerou o desenvolvimento da doença (ELAD, 1990). Do mesmo modo, o alto nível de etileno presente no mutante *epinastic* poderia estar beneficiando o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa, conjuntamente ao aumento da susceptibilidade a doença (aumento no percentual de plantas infectadas). Já a redução do diâmetro do caule detectada na avaliação relaciona-se a maior expansão celular observada no mutante *epinastic*, sendo que as hastes e os pecíolos são mais espessos do que as plantas selvagens (BARRY et al., 2001). Desse modo, a redução na variação da média dos diâmetros, quando comparada às plantas de ‘Micro-Tom’ está mais correlacionada ao aumento da espessura das plantas não inoculadas,

como se pode observar na figura 12, sendo que a alta produção de etileno no mutante aparentemente não influencia diretamente na patogênese, porém aumenta a susceptibilidade.

Avaliando o número de plantas sintomáticas e a variação de engrossamento do caule em relação ao controle, percebe-se que a falta de ácido abscísico que ocorre no mutante *notabilis*, favorece o aparecimento de maior número de plantas sintomáticas e aumenta os sintomas de engrossamento. Embora a interação desse mutante com o fungo *M. perniciosa* aumente os sintomas da doença vassoura-de-bruxa, na grande maioria das infecções em tomateiro, os baixos níveis de ABA estão ligados a diminuição da susceptibilidade ao patógeno (ASSELBERGH; DE VLEESSCHAUWER; HÖFTE, 2008). Contudo, trabalhos realizados com *Arabidopsis thaliana*, demonstraram que na interação do fungo necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum* com mutantes *abi1* e *abi2*, insensíveis a ABA, houve um aumento efetivo na susceptibilidade (GUIMARÃES; STOTZ, 2004), pois os mutantes não promovem o fechamento estomático, de modo que o ácido abscísico é imprescindível nesse mecanismo, podendo possibilitar um aumento considerável na penetração e colonização dos tecidos pelo fungo. Esse possível aumento da colonização do fungo *M. perniciosa* do mutante *notabilis* pode ter contribuído na desorganização dos tecidos com aumento no volume e intensificação da divisão celular, visto que esses sintomas estão atrelados à infecção, aliados ao aumento do diâmetro nas plantas inoculadas comparadas ao controle 'Micro-Tom'. Ainda nesse contexto, mutantes defectivos na biossíntese de ABA (*aao3-2* e *aba2-12*) e insensível a ABA (*abi4*) demonstraram aumento na suscetibilidade aos patógenos necrotróficos *Pythium irregulare* e *Alternaria brassicicola*, sugerindo que a ativação do conjunto de genes de defesa mediados por JA não ocorra, visto que ABA regula positivamente a via do ácido jasmônico (ADIE et al., 2007). Desse modo, um aumento na susceptibilidade à vassoura-de-bruxa no mutante *notabilis* pode estar relacionado ao desbalanço hormonal entre AS/JA, no qual a redução nos níveis do ácido jasmônico nesse mutante devido a baixa produção de ABA e consequente aumento de ácido salicílico, contribuiria para o elevado número de plantas doentes.

Assim como *notabilis*, o mutante *procera*, supersensível a giberelina, apresentou sintomas da doença em todas as plantas desafiadas com o patógeno e um aumento significativo na espessura do caule. Sabe-se que o mutante *procera* possui perda de função na proteína *DELLA*, levando ao aumento de salicilato quando a planta é submetida a situações de estresse biótico e abiótico. Um quádruplo mutante para os genes das proteínas *DELLA* mostrou-se mais resistente a *Pseudomonas syringae* DC3000 e *Hyaloperonospora arabidopsis*, concomitante ao aumento da biossíntese e sinalização por AS (NAVARRO et al., 2008). O aumento de AS correlaciona-se com o decréscimo de JA e por consequência o

aumento da susceptibilidade a fungos necrotróficos como *Alternaria brassiciola* e *Botrytis cinerea* em mutantes inoculados (NAVARRO et al., 2008). Nas inoculações do mutante *procera* com *M. perniciosa*, o aumento no número de plantas sintomáticas pode estar ligado a redução dos níveis de JA e aumento de AS, corroborando com os resultados obtidos nas inoculações com o mutante *notabilis*. A giberelina produzida por fitopatógenos também pode influenciar no desenvolvimento de resistência ou susceptibilidade da planta à doença. O fungo *M. perniciosa* possui genes envolvidos na síntese de ácido giberélico (MONDEGO et al., 2008), sendo que caso esse hormônio fosse produzido poderia promover a degradação das proteínas *DELLA* e atenuar as respostas de defesa dependente de JA (BARI; JONES, 2009). Alguns indícios, como expressão de genes putativos para a via biossintética de giberelina e detecção de uma substância com massa molecular semelhante à giberelina comercial em amostras de sobrenadante da cultura de *M. perniciosa* sugerem a possível produção desse hormônio pelo patógeno (AMBRÓSIO et al., 2008). A possível produção de giberelina poderia também influenciar na patogênese de *M. perniciosa* no mutante *procera* considerando o efetivo aumento no diâmetro das plantas inoculadas em relação a ‘Micro-Tom’, de forma que os elevados níveis de GA relacionam-se à formação de galhas, que tem por característica a hipertrofia celular (NAKAGAWA, et al., 1987).

No segundo experimento, com início em 25/01/2010 e término em 01/03/2010, o ‘Micro-Tom’ apresentou 20 plantas infectadas de 30 inoculadas (66,7%) (Tabela 6), com sintomas visuais aos 15 dias após inoculação, e diâmetro médio aos 35 dias pós-inoculação de 0,99 cm contra 0,75 cm do controle, uma variação entre diâmetros de 0,24 cm (Figura 14). Neste experimento foi observado que as plantas 10 dias após a inoculação apresentavam um desenvolvimento mais lento do que as plantas não inoculadas, sendo que até aos 15 dias o diâmetro do controle foi sempre maior do que no inoculado. O mutante *Never ripe* apresentou cinco plantas sintomáticas aos 15 dias, e 14 plantas doentes aos 35 dias (46,7%) (Tabela 6). As plantas sintomáticas avaliadas nos primeiros 10 dias apresentaram desenvolvimento afetado, similar ao MT. O engrossamento médio do caule foi de 1,07 cm contra 0,66 do controle, uma variação de 0,41 cm entre diâmetros (Figura 14). O mutante *diageotropica* apresentou oito plantas sintomáticas aos 15 dias, e 15 plantas sintomáticas aos 35 dias (50%) (Tabela 6). As plantas sintomáticas avaliadas nos primeiros 10 dias não apresentaram efeitos no seu desenvolvimento. O engrossamento médio do caule foi de 1,0 cm contra 0,66 do controle, uma diferença entre diâmetro de 0,34 cm (Figura 14). O mutante *Curl3* apresentou quatro plantas sintomáticas aos 10 dias, e 18 plantas sintomáticas aos 35 dias (60%) (Tabela 6). Neste genótipo, a hiperplasia apareceu mais cedo em algumas plantas e atingiu um

tamanho estável, voltando a apresentar aumento no diâmetro após 25 dias, enquanto que nos outros mutantes, o aumento foi gradativo durante todo o período avaliado. O engrossamento médio do caule foi de 0,96 cm contra 0,38 do controle, uma variação entre diâmetros de 0,58 cm (Figura 14).

O transgênico *CKX2* apresentou três plantas sintomáticas aos 10 dias, e aos 35 d após a inoculação apresentou 10 plantas doentes em um total de 20 plantas inoculadas (50%) (Tabela 6). O engrossamento médio do caule foi de 0,96 cm contra 0,57 do controle, uma diferença entre diâmetros de 0,39 cm (Figura 14). Neste genótipo, a hiperplasia também apareceu mais cedo em algumas plantas, e atingiu um tamanho estável, sem variação nos dias avaliados, diferente do engrossamento gradativo dos demais mutantes, exceto o *curl3*. No genótipo transgênico, nota-se que houve um engrossamento inicial, seguido de engrossamento similar ao controle.

Em suma, na avaliação sintomatológica dos genótipos, o espessamento do caule foi evidenciado (Figura 15), porém o número de plantas doentes assim como a variação do diâmetro do caule mostrou-se variável.

Tabela 6 - Genótipos (MT, *Nr*, *dgt*, *curl3* e *CKX2*) inoculados com basidiósporos do fungo *M. perniciosa* do biótipo-S, número e porcentagem de plantas sintomáticas

Genótipos	Nº plantas doentes	Porcentagem de plantas sintomáticas (%)
Micro-Tom (MT)	20	66,7%
<i>Never ripe</i> (<i>Nr</i>)	14	46,7%
<i>diageotropica</i> (<i>dgt</i>)	15	50%
<i>curl3</i> (<i>cu3</i>)	18	60%
<i>CKX2</i>	10	50%

Figura 14 - Acompanhamento da média do diâmetro do caule de plantas inoculadas (linha vermelha) dos genótipos 'Micro-Tom', *Never ripe*, *diagiotropica*, *curl3* e *CKX2* a cada cinco dias após a inoculação com basidiósporos do biótipo-S, e de plantas não inoculadas, controle (linha azul)

Figura 15 - Fotos de ‘Micro-Tom’, mutantes hormonais (*Never ripe*, *diagiotropica* e *curl3*) e planta transgênica (*CKX2*) no experimento de inoculação com basidiósporos de *M. perniciosa* do biótipo-S

Análises bioquímicas em tecidos de *T. cacao* infectados com *M. perniciosa* demonstraram aumento nos níveis de diversos compostos, incluindo o hormônio etileno no início da infecção (SCARPARI et al., 2005). Além disso, sabe-se que fungo *Moniliophthora perniciosa* possui em seu genoma a presença dos chamados NLPs (*Nep1-like proteins*), que são peptídeos que funcionam como elicitores aptos a induzir a planta produzir etileno e causar a necrose nos tecidos do cacaueiro (GARCIA et al., 2007). Dessa forma, concentrações ou níveis elevados de etileno demonstram importância no desenvolvimento de sintomas da vassoura-de-bruxa. Sendo assim, o mutante *Never ripe*, por possuir baixa sensibilidade a

etileno, apresentou redução no número de plantas com sintomas da doença, se opondo ao resultado obtido no mutante *epinastic* com altos níveis de etileno o qual demonstrou aumento no número de plantas sintomáticas quando comparado com ‘Micro-Tom’. Do mesmo modo, mutantes de tomate *Never ripe* inoculados com o fungo necrotrófico *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* e as bactérias *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* com ciclo de vida biotrófico-necrotrófico, exibiram significativa redução nos sintomas da doença quando comparados as plantas de tomateiros selvagens (LUND; STALL; KLEE, 1998). Apesar da diminuição do número de plantas sintomáticas em *Never ripe*, as plantas que desenvolveram a infecção apresentaram maior variação do diâmetro no caule quando comparadas a ‘Micro-Tom’, demonstrando que baixa sensibilidade de etileno contribuiu para o aumento do diâmetro caulinar.

O mutante *diageotropica* com baixa sensibilidade a auxina, assim como *Never ripe* apresentou redução no número de plantas com a doença vassoura-de-bruxa. Kilaru e Hasenstein (2005) demonstraram que altos níveis de auxina podem facilitar a colonização do fungo *M. perniciosa* e possivelmente, a transição da fase biotrófica para necrotrófica da doença. Considerando que auxina possui papel crucial no estabelecimento e desenvolvimento doença, o mutante *diageotropica* não apresenta condições ideais para uma infecção mais efetiva. Da mesma forma que os outros mutantes avaliados nesse experimento, a falta do hormônio citocinina no transgênico *CKX2* diminui o número de plantas sintomáticas inoculadas com o fungo causador da vassoura-de-bruxa. Na tentativa de associar as alterações nos tecidos colonizados com o aumento de citocinina, Orchard et al. (1994) avaliaram os níveis desse hormônio em tecidos saudáveis e infectados com *M. perniciosa*. Contudo, dos quatro principais tipos de citocinina investigada, apenas a zeatina ribosídeo apresentou aumento na concentração nos tecidos infectados, sugerindo que as citocininas poderiam estar envolvidas no desenvolvimento da vassoura-de-bruxa por meio de ações locais e bastante específicas. Além disso, sabe-se que a maioria das doenças que se correlacionam com um crescimento anormal dos tecidos, como formação de galhas e nódulos está ligada com desbalanço hormonal de citocinina (JAMESON, 2000), de forma que o transgênico *CKX2* por possuir baixos níveis desse hormônio na planta, pode ter contribuído na redução do número de plantas com sintomas da doença.

Como previamente observado, a infecção do fungo *M. perniciosa* no mutante com baixa sensibilidade a brassinoesteróide (*curl3*) reduziu sutilmente o número de plantas doentes quando comparado ao controle ‘Micro-Tom’. Campos et al. (2009), demonstraram que em tomateiro, o hormônio brassinoesteróide parece controlar negativamente a via de JA,

semelhante ao antagonismo presente entre essa mesma via e o AS. O hormônio BR por apresentar baixa solubilidade em água é pouco translocável nas plantas (SYMONS et al., 2008), e dessa forma necessita da ativação de proteínas da família Bet v 1 para permitir a movimentação desse hormônio esteróide. Essa família proteica é ativada em resposta a ataque de patógenos nas plantas, podendo ser induzida pelo hormônio AS (ZIADI et al., 2001). Sendo assim, o mutante *curl3*, com baixa sensibilidade a BR, não regula negativamente a via de JA, visto que essa via hormonal estaria ativa no mutante em questão, podendo contribuir na redução no número de plantas com sintomas da doença vassoura-de-bruxa. Apesar da redução no número de plantas sintomáticas, em se tratando da patogênese da doença vassoura-de-bruxa nos mutantes *dgt* e *curl3* e no transgênico *CKX2*, foi possível observar que a baixa sensibilidade a auxina e brassinoesteróide e o baixo nível de citocinina contribuíram para o aumento no diâmetro do caule das plantas inoculadas quando comparadas ao ‘Micro-Tom’, possivelmente devido algum desequilíbrio hormonal que permitiu, nas plantas as quais a infecção foi efetiva, a intensificação nos sintomas de hiperplasia e hipertrofia celular.

No terceiro experimento, com início em 01/10/2010 e término em 05/11/2010 foram avaliados o mutante *jai1* e a linha transgênica *NahG* tendo como controle das inoculações ‘Micro-Tom’. Nas plantas inoculadas de ‘Micro-Tom’, 15 plantas foram sintomáticas em um total de 30 (50%), sendo que os primeiros sintomas foram observados com 15 dias após a inoculação (Tabela 7). A variação entre os diâmetros da planta controle e inoculada foi de 0,39 cm, com 0,60 cm da planta controle e 0,99 cm do MT inoculado (Figura 16). No mutante *jai1*, os sintomas característicos foram observados 15 dias pós-inoculação, com o valor dos diâmetros entre controle e planta inoculada de 0,64 cm e 0,98 cm respectivamente. A variação de espessura, comparado controle e planta inoculada, teve valor de 0,34 cm (Figura 16). Nesse mutante, 21 plantas apresentaram sintomas (70%) (Tabela 7), sendo a presença de ‘vassouras-verdes’ o sintoma mais recorrente. Por fim, o transgênico *NahG* obteve o menor número de plantas sintomáticas entre os genótipos avaliados, com cinco plantas dentre 30 repetições (16,7%), sendo os primeiros sintomas visualizados apenas 20 dias após infecção (Tabela 7). O diâmetro da planta não-inoculada apresentou 0,73 cm e a da inoculada 1,05 cm, variação de espessura de 0,32 cm (Figura 16). Assim como nos experimentos anteriores, o ‘Micro-Tom’, o mutante defeituoso na via de transdução de jasmonato (*jai1*) e o transgênico com baixos níveis de AS (*NahG*) mostraram-se sintomáticos (Figura 17).

Tabela 7 - Genótipos (MT, *jai1*, e *NahG*) inoculados com basidiósporos do fungo *M. perniciosa* do biótipo-S, número e porcentagem de plantas sintomáticas

Genótipos	Nº plantas doentes	Porcentagem de plantas sintomáticas (%)
Micro-Tom (MT)	15	50%
<i>jasmonic acid insensitive (jai1)</i>	21	70%
<i>NahG</i>	5	16,7%

Figura 16 - Acompanhamento da média do diâmetro do caule de plantas inoculadas (linha vermelha) dos genótipos ‘Micro-Tom’, *jasmonic acid insensitive*, e *NahG* a cada cinco dias após a inoculação com basidiósporos do biótipo-S, e de plantas não inoculadas, controle (linha azul)

Figura 17 - Fotos de ‘Micro-Tom’, mutante hormonal (*jai1*) e planta transgênica (*NahG*) no experimento de inoculação com basidiósporos de *M. perniciosa* do biótipo-S

Como observado anteriormente nos dados sintomatológicos, o mutante *jai1* demonstrou aumento na susceptibilidade (número de plantas doentes) à doença vassoura-de-bruxa. Da mesma forma, os mutantes de tomateiro com baixos níveis de jasmonato (*def1*) e com reduzida expressão de prosistemina (PSas) quando inoculados com o fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* apresentaram uma maior susceptibilidade comparados ao controle (DIAZ; TEN HAVE; VAN KAN, 2002). O mutante *def1* também demonstrou ser mais susceptível em inoculações feitas com o hemibiotrófico *Phytophthora infestans* (THALER; OWEN; HIGGINS, 2004).

Nesse mesmo experimento, para estabelecer a importância do hormônio ácido salicílico frente o desenvolvimento dos sintomas da doença utilizou-se o transgênico *NahG*. Esse transgênico, o qual demonstrou ser o menos susceptível à *M. perniciosa*, expressa o gene que codifica para a enzima salicilato hidroxilase, que impede o acúmulo de AS pela transformação deste em catecol (DELANEY et al., 1994). Catecol é um composto fenólico, sendo conhecido como substâncias fungitóxicas, antibacterianas e antiviróticas, podendo associar-se a resistência a doenças (VIDHYSEKARAN, 1988). Além disso, esse composto causa a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo que a produção de H_2O_2 é

considerada um regulador positivo de resistência a doenças (VAN WEES; GLAZEBROOK, 2003). H_2O_2 está envolvido na insolubilização de proteínas estruturais da parede celular, formando uma barreira mecânica para penetração fúngica e difusão de toxinas e enzimas de degradação da parede celular (BRADLEY; KJELLBOM; LAMB, 1992). Essa ROS também atua como sinalizador para indução de expressão de genes de defesa (LEVINE et al., 1994), sendo que um aumento na produção de H_2O_2 reduz o crescimento bacteriano e fúngico (WU, et al., 1995). Conjuntamente à presença de catecol, a impossibilidade de *NahG* acumular o hormônio AS também pode estar relacionado à diminuição do número de plantas sintomáticas assim como redução no engrossamento do caule das plantas infectadas. Desse modo, a falta de AS no transgênico permite que a via do JA seja ativada, sendo que essa interação negativa elucidada em *Arabidopsis thaliana* (GLAZEBROOK, 2005), também parece associar-se a tomate (PEÑA-CORTES et al., 1993). Da mesma forma, plantas *NahG* infectadas com a bactéria hemibiotrófica *Pseudomonas syringae* apresentou aumento na expressão de genes induzidos por ácido jasmônico (SPOEL et al., 2003). Associando os dois genótipos utilizados nessa avaliação (*jail* e *NahG*) é possível observar o contraponto entre ácido jasmônico e ácido salicílico. O mutante com baixa sensibilidade a JA demonstrou um aumento efetivo na susceptibilidade, indicando que o baixo nível desse hormônio contribui para o sucesso do fungo na colonização dos tecidos vegetais. No outro extremo, as plantas *NahG* com baixo nível de AS reduziu o número de plantas doentes, de forma que a impossibilidade do acúmulo de ácido salicílico nesse transgênico resultou em níveis aumentados de ácido jasmônico, permitindo uma sinalização adequada diante da infecção fúngica.

No quarto experimento, com início em 06/03/2012 e término em 10/04/2012, foi avaliada a linha transgênica *prosistemina* tendo como controle da inoculação ‘Micro-Tom’. Para ‘Micro-Tom’, 17 plantas foram sintomáticas em um total de 30 (56,7%), sendo que os primeiros sintomas foram observados com 15 dias após a inoculação (Tabela 8). A variação entre os diâmetros da planta controle e inoculada foi de 0,38 cm, com 0,49 cm da planta controle e 0,87 cm do MT inoculado (Figura 18). No transgênico *prosistemina*, os sintomas característicos foram observados 15 dias pós-inoculação, sendo que aos 35 d após a inoculação 14 plantas mostraram-se sintomáticas (46,7%). O valor médio do diâmetro controle de 0,49 cm e de 0,90 para planta inoculada, resultando em uma variação entre diâmetros de 0,41 (Figura 18). O transgênico avaliado, além de sintomas de engrossamento do caule (Figura 19), característico da vassoura-de-bruxa, também apresentou ‘vassouras verdes’ a partir de 15 dias após a inoculação com o fungo.

Tabela 8 - Genótipos (MT e *prosistemina*) inoculados com basidiósporos do fungo *M. perniciosa* do biótipo-S, número e porcentagem de plantas sintomáticas

Genótipos	Nº plantas doentes	Porcentagem de plantas sintomáticas (%)
Micro-Tom (MT)	17	56,7%
<i>prosistemina</i>	14	46,7%

Figura 18 - Acompanhamento da média do diâmetro do caule de plantas inoculadas (linha vermelha) dos genótipos ‘Micro-Tom’ e *prosistemina* a cada cinco dias após a inoculação com basidiósporos do biótipo-S, e de plantas não inoculadas, controle (linha azul)

Figura 19 - Fotos de ‘Micro-Tom’ e da planta transgênica (*prosistemina*) no experimento de inoculação com basidiósporos de *M. perniciosa* do biótipo-S

Nessa avaliação sintomatológica, o transgênico de tomateiro expressa constitutivamente a prosistemina, sendo esse um peptídeo de 200 aminoácidos que é processado na planta para originar o peptídeo ativo, a sistemina (MCGURL et al., 1992). A sistemina, por sua vez, é um peptídeo de 18 aminoácidos encontrado em solanáceas, o qual

atua nos tecidos vasculares ativando a cascata de sinalização do ácido jasmônico, provocando uma reação de defesa sistêmica na planta (STRATMANN, 2003). Contrariamente ao mutante *jail* que possui baixa sensibilidade a JA, a ativação da via desse mesmo hormônio no transgênico *prosistemina* reduziu os sintomas da doença vassoura-de-bruxa quando comparado ao controle ‘Micro-Tom’. Da mesma forma, plantas transgênicas que super-expressam o gene *prosistemina* inoculadas com o fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* demonstraram maior resistência à doença em comparação ao controle (DIAZ; TEN HAVE; VAN KAN, 2002). Também, contrário ao mutante *jail* que demonstrou redução no diâmetro do caule das plantas infectadas em comparação à MT, o transgênico *prosistemina* apresentou aumento na média do engrossamento caulinar, indicando que apesar de JA propiciar redução na susceptibilidade a doença vassoura-de-bruxa, na patogênese os sintomas são intensificados.

Os resultados obtidos com a inoculação dos mutantes hormonais e plantas transgênicas aumentam especulações de que uma maior susceptibilidade à vassoura-de-bruxa relaciona-se ao aumento nos níveis do hormônio AS, e a redução na susceptibilidade ao hormônio JA. Em *T. cacao* a resistência à vassoura-de-bruxa também parece estar atrelada a sinalização via JA, de modo que o acesso ‘CAB 214’ que se mostra resistente a *M. perniciosa*, apresentou aumento significativo na expressão de genes da rota biossintética de ácido jasmônico, não sendo observada essa mesma resposta no acesso susceptível ‘P7’ (LITHOLDO JUNIOR, 2009). Sustentando essa afirmação, podem-se integrar os resultados obtidos dos diferentes genótipos inoculados, sendo que os mutantes *notabilis*, *procera* e *jail*, que apresentaram aumento no número de plantas sintomáticas, e de forma direta (*jail*) ou indiretamente (*notabilis* e *procera*) demonstram interferir no balanço AS/JA, de modo que níveis reduzidos do hormônio jasmonato contribuiriam para uma infecção mais efetiva do fungo *M. perniciosa*. Em contrapartida, os mutante *curl3* e os transgênicos *NahG* e *prosistemina*, os quais foram menos susceptíveis a vassoura-de-bruxa, por apresentarem níveis aumentados de JA quando comparados a MT, apresentaram uma redução efetiva no número de plantas doentes. Esses dados sintomatológicos entre *M. perniciosa* e os diversos mutantes e transgênicos utilizados nas inoculações demonstram seguir o modelo de interação entre AS e JA, em que AS bloquearia a via de JA, rendendo a planta susceptibilidade à infecção. Os outros hormônios (ET, ABA, GA, AUX, BR e CK) avaliados nos experimentos previamente apresentados, teriam papel secundário na infecção com *M. perniciosa*, seja interferindo no *cross-talk* entre AS e JA ou atuando de forma específica no desenvolvimento dos sintomas da doença.

5.5 Caracterização sintomatológica da interação de *M. perniciosa* do biótipo-C e ‘Micro-Tom’

Inoculações com isolados do fungo *M. perniciosa* do biótipo-C provenientes de vassouras de *T. cacao* em *Solanum lycopersicon* cv Micro-Tom foram realizadas para avaliar uma possível ocorrência de infecção cruzada com desenvolvimento de sintomas característicos da doença vassoura-de-bruxa. Para essa finalidade, utilizou-se um lote de 35 plântulas, sendo que após dois dias do transplante, 30 foram inoculadas com basidiósporos do biótipo-C e cinco plântulas mantiveram-se como controle do experimento. As avaliações iniciaram-se no quinto dia após a inoculação, sendo repetida a cada cinco dias, com término 35 dias posteriores a inoculação. As análises pautaram-se em medições caulinares para quantificar seu engrossamento e detecção de vassouras laterais.

Inicialmente, tanto as plantas controle quanto inoculadas apresentaram desenvolvimento equiparado, tendo aos cinco dias, a média de diâmetro do caule da planta controle e inoculado, 0,23 e 0,24 cm, respectivamente. No decorrer das avaliações, as plantas desafiadas com o patógeno do biótipo-C tiveram retardo em seu crescimento, com média final do diâmetro de 0,46 contra 0,54 da planta não inoculada (Figura 20). Outra característica observada nas plantas inoculadas foi a redução na altura em 63% do total avaliado (Figura 21), além de excessivas brotações laterais em 40% das plantas.

Sabe-se que o crescimento das plantas está relacionado ao hormônio giberelina, e em contrapartida o ácido jasmônico está associado com a defesa da planta e tem propriedades ligadas à repressão do crescimento, sendo a sinalização por esses hormônios (GA e JA) regulada antagonicamente na defesa contra patógenos necrotróficos (PAUWELS; INZÉ; GOOSSENS, 2009). Enquanto GA promove o crescimento da planta através da degradação da proteína DELLA (LEIVAR; QUAIL, 2011), JA atua na supressão do crescimento e ativação de genes de defesa por meio da degradação da proteína JAZ (do inglês, *Jasmonate-Zim Domain*) (YAN et al., 2007). Estudos demonstram que as proteínas JAZ e DELLA são capazes de interagirem na regulação hormonal de JA e GA, associando assim a resposta de defesa com o crescimento das plantas (HOU et al., 2010). Quando a planta é desafiada por um patógeno necrotrófico, a sinalização via ácido jasmônico deve ser rapidamente ativada através da degradação de JAZ, porém essa leva à supressão do crescimento vegetal por meio da interação entre a proteína DELLA e o fator de transcrição PIF (do inglês, *Phytochrome Interacting Factor*) envolvido no crescimento da planta mediado por GA. Esse mecanismo faz

com que a alocação de recursos necessários para o crescimento das plantas seja limitado (KAZAN; MANNERS, 2012). Sendo assim, a redução no crescimento das plantas inoculadas com *M. pernicioso* do biótipo-C pode estar associada à ativação da via do ácido jasmônico contribuindo na resistência da planta ao patógeno, contudo prejudicando o seu crescimento devido à interação antagônica entre DELLA-JAZ.

Figura 20 - Acompanhamento da média de diâmetro do caule de plantas inoculadas (linha vermelha) de ‘Micro-Tom’, a cada cinco dias após a inoculação com basidiósporos do biótipo-C, e de plantas não inoculada, controle (linha azul)

Figura 21 - Foto de plantas de ‘Micro-Tom’ controle não inoculada e planta inoculada com basidiósporos de *M. pernicioso* do biótipo-C com redução na altura

Inoculações de isolados de *M. pernicioso* obtidos de *T. cacao* em *Solanum paniculatum*, realizadas por Lopes, Luz e Bezerra (2001) demonstraram sintomas não tão característicos da vassoura-de-bruxa, com leve hipertrofia e hiperplasia, sendo que a comprovação da presença de hifas do patógeno nos tecidos do hospedeiro foi possível apenas por meio de cortes histológicos. Contudo, o experimento aqui realizado com inoculação do ‘Micro-Tom’ com *M. pernicioso* do biótipo-C, não foi possível observar sintomas de espessamento do caule e vassouras verdes (Figura 22). A infecção de *S. paniculatum* por isolado de cacaueteiro deve-se provavelmente a especificidade do isolado.

As plantas desafiadas com o fungo *M. pernicioso* completaram juntamente com o controle o seu ciclo, produzindo frutos, e não se observando a infecção cruzada. De modo similar, Bastos e Evans (1985) isolaram basidiósporos de vassouras de plantas de solanáceas silvestres (*Solanum rugosum* Dum. e *S. lasiantherum* v. Heurck), e posteriormente inocularam cacaueteiros ‘ICS39’, susceptíveis a vassoura-de-bruxa. As plantas de *T. cacao* não apresentaram sintomas da doença e mantiveram-se saudáveis, não ocorrendo a infecção de cacaueteiro por isolados provenientes de Solanaceae. A patogenicidade cruzada de *M. pernicioso* também foi testada com isolados do biótipo-C em mudas de *Theobroma* spp., *Herrania* spp. e solanáceas, sendo que os isolados foram patogênicos em *T. cacao*, *T. speciosum* e *Herrania* spp, e em contraste para *Solanum esculentum*, *S. melongena* e *S. gilo*, nenhum sintoma foi observado (BASTOS et al., 1988). Adicionalmente, estudos de diversidade genética baseados na análise de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (YAMADA et al., 1998) e regiões repetitivas de DNA (ERIC-PCR) (ARRUDA et al., 2003) demonstraram que a maioria dos isolados de solanáceas são distintos dos isolados provenientes de *T. cacao*.

Figura 22 - Caules de planta controle (círculo vermelho) e inoculada (círculo branco) sem espessamento característico da doença vassoura-de-bruxa

5.6 Avaliação da interação de *M. perniciosa* do biótipo-C com mutantes hormonais e plantas transgênicas de ‘Micro-Tom’

Inoculações com isolados do fungo *M. perniciosa* do biótipo-C provenientes de vassouras de *T. cacao* em mutantes e plantas transgênicas com alterações nas vias de biossíntese ou percepção hormonal, foram realizadas para avaliar uma possível ocorrência de infecção cruzada, quebrando a resistência à doença com desenvolvimento de sintomas característicos da vassoura-de-bruxa.

As classes hormonais e os genótipos associados à alteração da via hormonal avaliados para resposta a infecção por isolado do biótipo-C foram brassinoesteróide (*curl3*), auxina (*diagiotropica*), etileno (*epinastic* e *Never ripe*), ácido abscísico (*notabilis*) giberelina (*procera*), ácido jasmônico (*jasmonic acid insensitive 1*), citocinina (*CKX2*) e ácido salicílico (*NahG*). Todos os genótipos se encontravam no *background* genético ‘Micro-Tom’. Pela disponibilidade de espaço em casa de vegetação, as avaliações foram divididas em dois experimentos distintos, tendo sempre ‘Micro-Tom’ como controle. Em todos os experimentos, foram utilizadas cinco plantas não inoculadas como controle e 30 inoculadas. No primeiro experimento foram avaliados os mutantes: *epinastic*, *diagiotropica*, *notabilis*, *Never ripe*, *procera* e a linha transgênica *CKX2*; e no segundo os mutantes avaliados foram *Curl3*, *jai1* e a linha transgênica *NahG*.

A avaliação geral dos dois experimentos revelou que nenhum dos genótipos (mutantes e transgênicos) inoculados com biótipo-C desenvolveram os sintomas característicos de vassoura-de-bruxa, demonstrando que a ausência/baixa sensibilidade ou supersensibilidade aos diversos hormônios vegetais, não é capaz de quebrar a resistência das plantas ao biótipo-C de *M. perniciosa*.

No primeiro experimento, com início em 16/06/2010 e término em 21/07/2010, assim como apresentado anteriormente em 'Micro-Tom', os mutantes e a linha transgênica inoculados apresentaram redução no diâmetro do caule comparado as plantas controle. O mutante *epinastic* apresentou engrossamento médio do caule de 0,46 cm contra 0,49 do controle (Figura 23), tendo redução da altura em 37% das plantas inoculadas (Figura 24). O mutante *notabilis* teve engrossamento médio do caule de 0,45 cm contra 0,50 do controle (Figura 23), e redução de altura em 64% das plantas inoculadas (Figura 24). No mutante *procera* o engrossamento médio do caule foi de 0,44 cm contra 0,51 do controle (Figura 23), tendo 25% de plantas com redução na altura (Figura 24). O mutante *diagiotropica* teve engrossamento médio do caule de 0,41 cm contra 0,53 do controle (Figura 23), tendo 40% de plantas com redução na altura (Figura 24). O genótipo transgênico *CKX2* apresentou engrossamento do caule médio de 0,27 cm contra 0,32 do controle (Figura 23), porém notou-se que não houve uma redução considerável no porte das plantas inoculadas (Figura 24). O mutante *Never ripe* apresentou engrossamento do caule médio de 0,45 cm contra 0,49 do controle (Figura 23), tendo redução na altura de 60% das plantas inoculadas (Figura 24).

Figura 23 - Acompanhamento da média do diâmetro do caule de plantas inoculadas (linha vermelha) dos genótipos ‘Micro-Tom’, *epinastic*, *notabilis*, *procera*, *diagiotropica*, *CKX2* e *Never ripe* a cada cinco dias após a inoculação com basidiósporos do biótipo-C, e de plantas não inoculadas, controle (linha azul)

Figura 24 - Fotos de ‘Micro-Tom’, mutantes hormonais (*epinastic*, *notabilis*, *procera*, *diagiotropica*, *Never ripe*) e do transgênico (*CKX2*) no experimento de inoculação com basidiósporos de *M. perniciosa* do biótipo-C, sem sintomas característicos da doença vassoura-de-bruxa

O segundo experimento, com início em 10/03/2011 e término em 14/04/2011, com os mutantes *jail* e *cu3* e a linha transgênica *NahG* também teve como controle das inoculações o ‘Micro-Tom’. Assim como no primeiro experimento, o ‘Micro-Tom’, não desenvolveu sintomas característicos da doença vassoura-de-bruxa quando inoculado com isolado do biótipo-C e o desenvolvimento das plantas inoculadas foi considerado inferior ao controle com diâmetro médio de 0,61 cm e de 0,73 cm para planta não inoculada (Figura 25). Em 61% das plantas de MT inoculadas, foi possível observar redução na altura (Figura 26). No mutante *jail* os valores médios dos diâmetros entre controle e planta inoculada foram de 0,64 cm e 0,56 cm respectivamente (Figura 25), sem alteração na altura das plantas desafiadas com o patógeno (Figura 26). O mutante *curl3* teve engrossamento médio do caule de 0,35 cm contra 0,37 do controle (Figura 25), não apresentando diferenças na altura entre as plantas inoculadas e não inoculadas (Figura 26). Por fim, o transgênico *NahG* demonstrou diâmetro da planta não-inoculada de 0,64 cm e a da inoculada 0,56 cm (Figura 25), além de redução na altura de 50% das plantas avaliadas (Figura 26).

Figura 25 - Acompanhamento da média do diâmetro do caule de plantas inoculadas (linha vermelha) dos genótipos ‘Micro-Tom’, *jai1*, *curl3* e *NahG* a cada cinco dias após a inoculação com basidiósporos do biótipo-C, e de plantas não inoculadas, controle (linha azul)

Figura 26 - Fotos dos mutantes hormonais (*jai1* e *curl3*), transgênico (*NahG*) e ‘Micro-Tom’ no experimento de inoculação com basidiósporos de *M. perniciosa* do biótipo-C, sem sintomas característicos da doença vassoura-de-bruxa

Apesar das plantas inoculadas com *M. perniciosa* do biótipo-C não desenvolverem sintomas característicos da doença vassoura-de-bruxa, foi possível observar que as plantas desafiadas reduziram seu crescimento. Sendo assim, pode-se concluir que as plantas não permitem de forma passiva a entrada de patógenos em seu interior, sendo que as agressões propiciadas pelos agentes infecciosos podem vir a ser percebidas, e sua capacidade de adaptação permite que sobrevivam, mesmo tendo por muitas vezes seu crescimento prejudicado (BARROS et al., 2010). Essa redução na altura evidenciada na maioria dos genótipos inoculados com o fungo *M. perniciosa* biótipo-C, assim como em ‘Micro-Tom’, pode estar ligado a um desbalanço hormonal na relação entre JA e GA. Sendo assim, nas plantas inoculadas resistentes ao fungo em questão, a via do ácido jasmônico estaria ativa e consequentemente suprimiria o crescimento das plantas mediante a redução nos níveis de giberelina por meio da interação entre as proteínas JAZ e DELLA (KAZAN; MANNERS, 2012).

5.7 Genes referência para análises de expressão gênica em ‘Micro-Tom’, mutantes hormonais e plantas transgênicas

Com intuito de definir genes de referência ou normalizadores apropriados à análise da expressão gênica em plantas de ‘Micro-Tom’, mutantes hormonais e plantas transgênicas inoculadas e não inoculadas com o fungo *M. perniciosa*, foi avaliada a estabilidade da expressão de sete genes codificadores para *actina*, *tubulina (beta tubulina)*, *fator de alongação 1 alfa (EF1α)*, *proteína fosfatase 2ª subunidade catalítica (PPA2Acs)*, *proteína ribossomal L2 (RPL2)*, *ubiquitina* e *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)*.

Inicialmente, utilizando-se um *pool* de cDNAs de plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas e não-inoculadas em diversos tempos de coletas, e diluídos a 1:10, 1:100 e 1:100 (v/v), foi estabelecida uma curva de eficiência para cada amplicon. Os valores de eficiência obtidos variaram de 0,85 (gene *EF1α*) a 1,00 (gene da *tubulina* e *PPA2Acs*), e os valores de R^2 foram igual ou acima de 0,98 (Tabela 9).

Tabela 9 – Valores de eficiência e R^2 dos candidatos a genes referência obtidos através de curva de eficiência por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

Gene	Eficiência	R^2
<i>Actina</i>	0,94	0,99
<i>Tubulina</i>	1,00	0,99
<i>EF1α</i>	0,85	0,98
<i>PPA2Acs</i>	1,00	0,98
<i>RPL2</i>	0,85	0,99
<i>Ubiquitina</i>	0,89	0,99
<i>GAPDH</i>	0,95	0,98

Em seguida, as amostras de cDNA sintetizadas a partir do RNA dos meristemas apicais de plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas e não inoculadas, foram diluídas a concentração de 1:10 (v/v); e submetidas as reações de RT-qPCR. Para o estudo da estabilidade dos possíveis genes referência foi usado o *software GeNorm*. Esse programa necessita que os valores de C_T s sejam transformados em quantidades relativas (Q). Pela fórmula Delta C_T , a amostra com maior nível de expressão, ou seja, menor C_T recebe valor 1 e os demais valores são subtraídos desta (VANDESOMPELE et al., 2002).

$$Q = E^{\Delta C_T}$$

$$Q = E^{(C_{T \text{ min}} - C_{T \text{ amostra}})}$$

Q = quantidade relativa;

E = eficiência da amplificação (2 = 100%);

$C_{T \text{ min}}$ = menor valor de C_T = C_T da amostra com maior expressão.

No programa *GeNorm*, os valores de estabilidade gênica foram medidos com base nos níveis de expressão não normalizados. Este *software* calcula a variação aos pares em todos os genes, definindo como valor M a média da variação de um gene em relação a todos os outros.

Quando se considerou os genes com melhor estabilidade, os genes codificadores da *tubulina*, *PPA2Ac* e *GAPDH* foram sugeridos pelo programa, sendo posteriormente utilizados na normalização dos genes alvo. A Figura 27 permite a visualização da estabilidade dos genes avaliados.

Figura 27 - Análise de expressão dos valores médios de estabilidade de genes referência em ‘Micro-Tom’ pelo programa *GeNorm*

5.8 Determinação da eficiência dos iniciadores específicos dos genes alvos para ‘Micro-Tom’, mutantes hormonais e plantas transgênicas

Utilizando-se um *pool* de cDNAs de plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas e não inoculadas em diversos tempos de coletas, e diluições seriadas a 1:10, 1:100 e 1:1000 (v/v) foram realizadas com o objetivo de estabelecer uma curva de eficiência para cada amplificador específico dos diversos genes.

Os valores de eficiência obtidos variaram de 0,80 (*Pti5* e *KNOX*) a 1,0 (*Osmotin*, *Peroxidase*, *PR1a*, *PR1b* e *OPR3*) e os valores de correlação R^2 foram iguais ou acima de 0,98 (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores de eficiência e R^2 dos genes alvos obtidos através de curva de eficiência por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

Gene	Eficiência	R^2
<i>Ve1</i>	0,97	0,98
<i>EIX1</i>	0,83	0,98
<i>KNOX</i>	0,80	0,99
<i>Osmotin</i>	1,00	0,98
<i>Chitinase</i>	0,85	0,99
<i>Chitinase II</i>	0,85	0,98
<i>Pti5</i>	0,80	0,99
<i>Peroxidase</i>	1,00	0,98
<i>PR1a</i>	1,00	0,98
<i>PR1b</i>	1,00	0,98
<i>PIN-II2x</i>	0,88	0,99
<i>AOC</i>	0,99	0,98
<i>PIN2</i>	0,86	0,98
<i>OPR3</i>	1,00	0,98

5.9 Detecção de transcritos de *RpL35* do fungo *M. perniciosa* biótipo-S e C em plantas de tomateiro inoculadas

O fungo *Moniliophthora perniciosa* pode ser detectado em tecidos infectados por meio de amplificação de transcritos reversos empregando genes específicos como *Actina*, *RpL35*, entre outros (LEAL JUNIOR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007). No presente trabalho, foi conduzida a detecção de transcritos do gene *RpL35* de *M. perniciosa* em tecidos inoculados e não-inoculados, a partir da curva de dissociação do produto amplificado (*melting*) por RT-qPCR específico, tendo como controle positivo o cDNA do fungo cultivado *in vitro*. A temperatura de *melting* para o gene do fungo foi em média de 87,6°C para todas as amostras analisadas, com pequenas variações. A detecção dos transcritos fúngicos foi realizada previamente à análise de RT-qPCR com os genes alvos, possibilitando selecionar apenas as plantas que foram infectadas efetivamente pelo fungo *M. perniciosa*.

Nas amostras de ‘Micro-Tom’ inoculadas com o biótipo-S, foi detectado a presença do fungo em todos os períodos analisados (48 h, 72h, 120 h, 240 h, 480 h e 720 h), sendo que a 48 h observou-se o maior número de plantas infectadas (Figura 28). Já na inoculação com o biótipo-C, as análises foram positivas para presença do fungo apenas até 48 h após a inoculação (Figura 29).

Figura 28 - Curva de dissociação do produto de PCR do gene *RpL35* de *M. pernicioso* em amostras inoculadas de 'Micro-Tom' (Inoc) com biótipo-S. F= controle positivo (cDNA *M. pernicioso* cultivada *in vitro*) e B= controle negativo (amostras não inoculadas e sem cDNA)

Figura 29 - Curva de dissociação do produto de PCR do gene *RpL35* de *M. perniciosa* em amostras inoculadas de 'Micro-Tom' (Inoc) com biótipo-C. F= controle positivo (cDNA *M. perniciosa* cultivada *in vitro*) e B= controle negativo (amostras não inoculadas e sem cDNA)

Os mutantes hormonais para brassinoesteróides (*curl3*) (Figura 30) e ácido jasmônico (*jai1*) (Figura 31) apresentaram transcritos do fungo 48 h após a inoculação; contudo a 120 h após a inoculação, os transcritos foram detectados apenas nas plantas do mutante *curl3*. Já para as plantas transgênicas *NahG* e *prosistemia* inoculadas, transcritos do fungo foram amplificados nos dois períodos avaliados 48 e 120 h (Figuras 32 e 33).

Figura 30 - Curva de dissociação do produto de PCR do gene *Rpl35* de *M. pernicioso* em amostras inoculadas do mutante *curl3* (Inoc) com biótipo-S. F= controle positivo (cDNA *M. pernicioso* cultivada *in vitro*) e B= controle negativo (amostras não inoculadas e sem cDNA)

Figura 31 - Curva de dissociação do produto de PCR do gene *Rpl35* de *M. pernicioso* em amostras inoculadas do mutante *jai1* (Inoc) com biótipo-S. F= controle positivo (cDNA *M. pernicioso* cultivada *in vitro*) e B= controle negativo (amostras não inoculadas e sem cDNA)

Figura 32 - Curva de dissociação do produto de PCR do gene *Rpl35* de *M. pernicioso* em amostras inoculadas do transgênico *NahG* (Inoc) com biótipo-S. F= controle positivo (cDNA *M. pernicioso* cultivada *in vitro*) e B= controle negativo (amostras não inoculadas e sem cDNA)

Figura 33 - Curva de dissociação do produto de PCR do gene *RpL35* de *M. perniciosa* em amostras inoculadas do transgênico *prosistemia* (Inoc) com biótipo-S. F= controle positivo (cDNA *M. perniciosa* cultivada *in vitro*) e B= controle negativo (amostras não inoculadas e sem cDNA)

Após a análise que detectou o fungo *M. perniciosa* no cDNA das plantas inoculadas dos diferentes genótipos, as amostras positivas, com acúmulo de transcritos fúngicos foram selecionadas para as avaliações de RT-qPCR com os genes referência e os genes alvos ligados a patogênese e a hormônios vegetais.

5.10 Caracterização da expressão gênica da interação entre *M. perniciosa* do biótipo-S e ‘Micro-Tom’

Ápices vegetativos de plantas de ‘Micro-Tom’ inoculados com *M. perniciosa* do biótipo-S foram coletados após 48 h, 72 h, 120 h, 240 h, 480 h (20 d) e 720 h (30 d) da inoculação para detecção de transcritos do fungo e avaliação da expressão diferencial de 14 genes-alvo de tomateiro (Tabela 4) por RT-qPCR.

Dos genes escolhidos, *Ve1* (*Verticillium disease resistance protein*) *PIN2* (*Wound-induced protease inhibitor II*), *PR1a* (*Pathogenesis-related protein – P4*), *PR1b* (*Pathogenesis-related protein – P6*); *PIN-II2x* (*Proteinase inhibitor II protein*); *Chitinase*; *Chitinase II*; *Osmotin* e *EIX1* (*EIX receptor 1*) estão relacionados com a resposta de defesa da planta; já os genes *Pti5* (*ERF/AP2 transcription factor family*); *KNOX* (*Transcription factor, homeobox, KNOTTED-1*) são fatores de transcrição; o gene *Peroxidase* está ligado ao metabolismo de radicais livres de oxigênio, e por fim os genes *AOC* (*Allene oxide cyclase*) e *OPR3* (*12-Oxophytodienoate reductase*) estão ligados a biossíntese de jasmonato.

Para as condições biológicas investigadas, a análise pelo programa *GeNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002) demonstrou que os genes de referência (Tabela 3) *PPA*, *GAPDH* e *tubulina* foram os que apresentaram a menor variação quantitativa de expressão nas amostras de ‘Micro-Tom’ analisadas, sendo escolhidos como genes de referência nas análises subsequentes. As avaliações foram realizadas com auxílio do programa REST 2009, o qual permite a análise a partir do uso de múltiplos genes normalizadores.

Na avaliação da expressão dos genes, 11 apresentaram acúmulo significativo de transcritos nas plantas infectadas. O período após a inoculação em que o maior número de genes apresentaram acúmulo de transcritos foi 48 h após a inoculação, seguido do momento 120 h (cinco dias). Os genes induzidos a 48 h após a inoculação foram *Pti5*, *EIX1*, *PIN2*, *PR1a*, *PR1b*, *Chitinase*, *Chitinase II*, *Osmotin*, *KNOX*, *Peroxidase* e *Ve1*, em relação aos três genes normalizadores, sendo que os genes *Chitinase II* e *Osmotin* tiveram valores acima de 80 vezes e *PR1a*, *PR1b* foram induzidos acima de 900 vezes. Ainda nesse período, o gene *OPR3* foi de forma significativa, regulado negativamente. Na avaliação subsequente (72 h), apenas os genes *PR1a* e *PR1b* mantiveram níveis de expressão significativos, porém com valores inferiores à avaliação de 48 h. Nessa análise, os genes *KNOX* e *Ve1* foram regulados negativamente (Figura 34).

Com 120 h (cinco dias) pós-inoculação, diversos genes voltaram a apresentar acúmulo de transcritos como *Pti5*, *PIN2*, *PR1a*, *PR1b*, *Chitinase*, *Chitinase II*, *Osmotin*, *KNOX* e *Peroxidase*, sendo que *PR1a* e *PR1b* apresentaram os maiores acúmulos de transcritos, com valores acima de 200 vezes em relação ao controle (Figura 34). Nos três últimos períodos avaliados (240, 480 e 720 h) posteriores a inoculação, a expressão de quase todos os genes foi cessada, exceto os gene *Ve1* a 240 h da inoculação, *Chitinase II* e *KNOX* a 480 h, porém os valores de indução não ultrapassaram 10 vezes em relação ao controle (Figura 34).

Figura 34 – Análise da expressão diferencial de 14 genes (Tabela 4) nos ápices vegetativos de ‘Micro-Tom’ inoculados com o fungo *M. perniciosa* do biótipo-S nas coletas realizadas nos períodos de 48 h, 72 h, 120 h, 240 h, 480 h (20 d) e 720 h (30 d) após a inoculação. A expressão relativa dos genes foi calculada pelo programa REST a partir dos valores de Ct determinado por RT-PCR quantitativo em tempo real, tendo como normalizadores os genes *PPA*; *GAPDH* e *tubulina*

As plantas possuem diversas estratégias para se proteger da invasão e posterior infecção causada pelos patógenos, sendo a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PR) um importante mecanismo de defesa, quando o contato entre patógeno-hospedeiro é estabelecido. Essas proteínas são induzidas tanto no local da infecção, como em uma resposta sistêmica da planta durante a resistência sistêmica adquirida (SAR) (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). Nas avaliações realizadas em períodos iniciais da infecção (48 a 120 h), altos níveis de transcritos relacionados às PR foram detectados. Os maiores níveis de expressão entre esse grupo de proteínas foi representado pelas PR-1, com o acúmulo de transcritos dos genes *PR1a* e *PR1b* os quais podem ser induzidos por patógenos ou o hormônio ácido

salicílico, sendo comumente usados como marcadores da resposta de SAR (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). O acúmulo das PR-1 pode ocorrer tanto em interações compatíveis como em incompatíveis, demonstrando que essas proteínas nem sempre atuam de forma efetiva na resistência contra patógenos.

Micélios do fungo *M. perniciosa* demonstraram produzir AS e possuir tolerância a esse hormônio (KILARU; BAILEY; HASENSTEIN, 2007). Além disso, plantas inoculadas e infectadas com a vassoura-de-bruxa apresentaram elevados níveis de AS quando comparadas com plantas sadias (CHAVES; GIANFAGNA, 2006), fazendo com que a via do ácido jasmônico, atuante na defesa contra patógenos necrotróficos, seja bloqueada. Corroborando com essa hipótese, nas avaliações realizadas nos períodos iniciais da infecção, os genes *AOC* e *OPR3* não apresentaram níveis significativos de transcritos, sendo esse último regulado negativamente. O aumento dos níveis de AS e das proteínas induzidas por esse hormônio, como no caso PR-1, poderia ser uma estratégia de patogenicidade do fungo, com o intuito de limitar a competição de outros patógenos durante desenvolvimento da vassoura-de-bruxa (MONDEGO et al., 2008) ou mesmo bloquear a via biossintética do ácido jasmônico. Os altos níveis de transcritos relacionados às proteínas PR-1 corroboram com a indução do fator de transcrição *Pti5*, que pertence a classe ERF (Fator de resposta a etileno), nas avaliações realizadas 48 h após a inoculação. Esse fator de transcrição regula a expressão de genes PR, principalmente os regulados por AS como os genes *PR-1* e *PR-2* (GU et al., 2002).

Além da família PR-1, proteínas relacionadas à patogênese como chitinases e osmotina também tiveram altos níveis de expressão no período de 48 e 120 h. Chitinases possuem efeito inibitório no crescimento fúngico, visto que clivam os polímeros da parede celular de quitina presente nos fungos (PROM; EGILLA, 2011). Contudo essa supressão no desenvolvimento do patógeno muitas vezes pode não ocorrer no processo infeccioso das plantas, pois a expressão da proteína pode ser insuficiente para contenção da infecção, ou mesmo pela insensibilidade do patógeno a proteína por meio de secreção de inibidores ou presença de camadas de proteção em torno das hifas (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). A proteína osmotina é induzida por patógenos ou estresse osmótico, induzindo a apoptose fúngica (NARASIMHAN et al., 2003). Contudo, da mesma forma que a proteína chitinase, a ação dessa proteína na infecção pode ser comprometida pela presença de glicoproteínas presentes na parede celular fúngica que protege da ação tóxica de osmotina.

Genes codificadores de peroxidases também tiveram altos níveis de expressão na fase inicial da infecção com o fungo *M. perniciosa*. Sabe-se que as peroxidases, presentes nos tecidos vegetais, participam de diversos processos fisiológicos de grande importância, como

lignificação, biossíntese de etileno, oxidação de AIA e oxidação de compostos fenólicos que se acumulam em resposta à infecção (KAWANO, 2003). Em se tratando da biossíntese do polímero lignina, a peroxidase atua na remoção de átomos de hidrogênio dos grupos alcoóis hidroxicinâmicos, cujos radicais se polimerizam para formação da lignina. Esse polímero ocorre na parede celular das plantas superiores, e juntamente com celulose e outros polissacarídeos, formam uma barreira física na tentativa de impedir a penetração e crescimento fúngico (VANCE; KIRK; SHERWOOD, 1980). A lignificação pode ainda causar modificações na parede celular para torná-la mais resistente ao ataque de enzimas hidrolíticas, impedir a difusão de toxinas produzidas pelo invasor e bloquear a utilização de nutrientes do hospedeiro pelo patógeno. Contudo, a elevada expressão da peroxidase nos períodos de 48 e 120 h, não foi suficiente para impedir a infecção do fungo *M. perniciosus* em ‘Micro-Tom’.

No processo de infecção do hospedeiro pelo patógeno, os *PAMPs/MAMPs* (JONES; DANGL, 2006) podem vir a ser reconhecidos pelo sistema de defesa da planta por meio de receptores transmembrana PRRs (*Pattern recognition receptors*) (BOLLER, 1995). A proteína fúngica *ethylene-inducing xylanase* de 22-kDa promove respostas de defesa em tabaco (*Nicotiana tabacum*) e tomate (*Solanum lycopersicum*), induzindo a biossíntese de etileno, expressão de proteínas relacionadas à patogênese, produção de fitoalexinas e induz a resposta de HR em determinadas espécies de plantas (RON; AVNI, 2004). Essa proteína fúngica liga-se a receptores EIX1 presente na membrana das células, sendo homóloga a receptores ricos em leucina chamados LRR-RLPs (do inglês, *Leucine Rich Repeat receptor protein*). Assim como o receptor EIX1, o gene *Ve1* (*Verticillium wilt disease resistance protein*) (KAWCHUK et al., 2001) também codifica uma LRR-RLPs e induz o acúmulo de proteínas PR em plantas desafiadas com patógenos (FRADIN; THOMMA, 2006). Na análise de expressão relativa, ambos os genes (*EIX1* e *Ve1*) apresentaram acúmulos de transcritos no período de 48 h após a inoculação, indicando um possível reconhecimento de *PAMPs/MAMPs* presentes no fungo *M. perniciosus*; no entanto, as respostas de defesas desencadeadas por esse reconhecimento não foram suficientes ou mesmo inespecíficas para cessar a infecção pelo fungo *M. perniciosus*.

O homeobox *KNOTTED-1* apresentou acúmulo de transcritos nos períodos de 48, 120 e 480 h após a inoculação com o fungo *M. perniciosus*. Essa proteína regula genes alvos que controlam a homeostase hormonal no meristema apical das plantas, modulando a abundância de giberelinas e citocininas (HAY; TSIANTIS, 2010). Trabalhos realizados com tabaco demonstraram que a superexpressão do fator de transcrição *KNOTTED-1* relaciona-se com o acúmulo de citocinina no meristema da planta, e por consequência um atraso na

senescência das folhas (ORI et al., 1999). Sendo assim, a expressão desse fator de transcrição nas plantas inoculadas com o fungo pode estar ligada ao aumento nos níveis de citocinina devido a presumível produção ou indução desse hormônio pelo *M. perniciosa* (ORCHARD et al., 1994) ou mesmo, a expressão esteja ligada apenas a manutenção da homeostase no meristema apical, visto que esse local é o ponto de inoculação das plantas. Já o inibidor de proteinase II (*PINII*) de tomate pode ser induzido em consequência direta de danos causados por insetos ou injúria mecânica (PEÑA-CORTÉS; FISAHN; WILLMITZER, 1995), sendo liberado nos tecidos feridos da planta de modo localizado e precoce. Contudo, o acúmulo dessa proteína pode ser detectado de modo sistêmico, sendo que a propagação dessa resposta para diversos tecidos da planta requer atuação de hormônios vegetais como ABA e JA (PEÑA-CORTÉS; FISAHN; WILLMITZER, 1995). Entretanto, nas avaliações feitas em plantas de MT inoculadas com *M. perniciosa* no presente trabalho, o material analisado delimitou-se na região do meristema apical, onde foi realizada a inoculação com basidiósporos. Desse modo, a expressão do gene *PINII* nos períodos iniciais da infecção (48 e 120 h), apresentou uma resposta de defesa apenas local, podendo ser ativada por ferimentos feitos no momento da inoculação das plantas, ou mesmo pela presença de insetos na casa de vegetação. Essa afirmação corrobora com a análise feita de genes associados à rota biossintética de jasmonato (*AOC* e *OPR3*) que não tiveram acúmulo significativo de transcritos em nenhum dos períodos avaliados. Sem a ativação desses genes, a sinalização sistêmica para a expressão do gene *PINII* não ocorre. Assim como *PINII*, a expressão do gene do inibidor de proteinase (*PINII-2x*) relaciona-se a ferimentos, herbivoria ou mesmo pela infecção de um patógeno. Essa proteinase é encontrada principalmente em Solanaceae e possui sinalização mediada por jasmonato (TAMHANE et al., 2009). No entanto, a expressão desse gene não foi observada em nenhum dos períodos avaliados.

A análise da expressão revela que a resposta de defesa 48 h após a inoculação é a mais intensa, sendo que uma segunda resposta acontece somente a 120 h, porém em menor intensidade. Contudo apesar de ocorrer a expressão de genes atuantes no reconhecimento do patógeno para ativação da resposta de defesa, o ‘Micro-Tom’ não demonstrou resistência a doença, possivelmente por que a resposta desencadeada não foi suficiente e intensa para inibição do crescimento do fungo e que possíveis efetores patogênicos poderiam ser capazes de suprimir a defesa mediada pelo reconhecimento de *PAMPs/MAMPs* (ABRAMOVITCH; MARTIN, 2004; NOMURA; MELOTTO; HE, 2005). Pode-se observar também uma constante ativação de genes marcadores associados com a resposta de defesa mediada pelo ácido salicílico, e uma redução de transcritos com genes relacionados com a resposta de

defesa mediada por jasmonato. Essas evidências corroboram a hipótese que a susceptibilidade em interações compatíveis entre ‘Micro-Tom’ e *M. perniciosa* estaria ligada ao aumento de AS com intuito de bloquear a rota biossintética de JA.

5.11 Caracterização da expressão gênica da interação entre *M. perniciosa* do biótipo-C e ‘Micro-Tom’

Meristemas apicais de plantas de ‘Micro-Tom’ foram inoculados com basidiósporos do biótipo-C e coletados após 48 h, 72 h, 120 h, 240 h, 480 h (20 d) e 720 h (30 d) da inoculação. As amostragens foram realizadas de forma aleatória, visto que não se observou sintomas característicos da vassoura-de-bruxa, tanto nas plantas coletadas quanto nas plantas restantes, as quais ficaram para avaliações sintomatológicas. As amostras de RNA obtidas a partir de plantas inoculadas e controles não-inoculados foram utilizadas para investigar a expressão diferencial de 14 genes-alvo (Tabela 4) associados com a resposta de defesa do tomateiro por RT-qPCR. Os genes normalizadores e alvos utilizados nessa avaliação foram os mesmos usados na caracterização da expressão gênica com isolados do biótipo-S.

Na avaliação da expressão dos 14 genes, 13 apresentaram aumento significativo de transcritos nas plantas infectadas. A ativação dos genes se deu no primeiro período avaliado, com 48 h após a inoculação, coincidindo com o período de detecção de transcritos do fungo na planta. Contudo, foi com 72 h após a infecção que ocorreu os maiores valores de expressão relativa dos genes.

Os genes que tiveram acúmulo de transcritos 48 h após a inoculação foram *Pti5*, *EIX1*, *PR1a*, *PR1b*, *Chitinase*, *Chitinase II*, *Osmotin*, *KNOX*, *Peroxidase* e *Ve1*, sendo que os genes *PR1a* e *PR1b* foram de induzidos pouco mais de 100 vezes em relação ao controle não-inoculado. No mesmo período de análise os genes *AOC* e *PIN-II2x* tiveram sua expressão reguladas negativamente. Diferentemente das avaliações realizadas com inoculações do fungo *M. perniciosa* do biótipo-S em ‘Micro-Tom’, a ativação dos genes foi mais intensa no período de 72 h, com indução de todos os genes avaliados, não sendo significativa apenas a expressão do gene *AOC*. Essa análise determinou ainda níveis altíssimos de transcritos para os genes *PR1a* e *PR1b* com valores acima de 1000 vezes (Figura 35).

Na análise das amostras de 120 h (5 dias) pós-inoculação dos genes abordados, apenas *Osmotin* e *Peroxidase* apresentaram níveis de expressão pouco acima de três vezes em relação ao controle. Além disso, os genes *PR1a* e *PR1b* foram significativamente menos acumulados. Já no período de 240 h (10 dias), os genes *PIN2* e *KNOX* apresentaram níveis de expressão que não ultrapassaram 10 vezes acima do controle (Figura 35). Os períodos subsequentes de avaliações (480 e 720 h) não demonstraram expressão diferencial de nenhum gene avaliado (dados não apresentados).

Figura 35 - Análise da expressão diferencial de 14 genes (Tabela 4) nos ápices vegetativos de ‘Micro-Tom’ inoculados com o fungo *M. perniciosa* do biótipo-C nas coletas realizadas nos períodos de 48 h, 72h, 120 h e 240 h após a inoculação. A expressão relativa dos genes foi calculada pelo programa REST a partir dos valores de Ct determinado por RT-PCR quantitativo em tempo real, tendo como normalizadores os genes *PPA*; *GAPDH* e *tubulina*

Apesar de não desenvolver sintomas características da doença vassoura-de-bruxa, plantas de ‘Micro-Tom’ inoculadas com isolados do biótipo-C provenientes de *T. cacao* apresentaram ativação dos genes relacionados a patogênese ou mesmo ao reconhecimento de *PAMPs/MAMPs* do patógeno. Contudo, as diferenças nas avaliações entre interações compatíveis (isolados do biótipo-S inoculados em ‘Micro-Tom’) e incompatíveis (isolados do biótipo-C inoculados em ‘Micro-Tom’) deram-se nos níveis de transcritos expressos em

períodos distintos de avaliação. Em plantas que se mostraram sintomáticas inoculadas com o biótipo-S, a resposta de maior intensidade e com maior número de genes expressos foi com 48 h após a inoculação. Já na interação de ‘Micro-Tom’ com isolados do biótipo-C a resposta mais intensa foi no período de 72 h pós-inoculação, sendo que os valores de indução, principalmente dos genes *PR1a* e *PR1b* mostraram-se mais elevados nesse tipo de interação. Ambos os genes (*PR1a* e *PR1b*), traduzem proteínas relacionadas à patogênese e encaixam-se em mecanismos sistêmicos de defesa, no qual a partir do sítio de infecção há a translocação de um sinal para diversas partes da planta, induzindo reações de defesa comumente instaurado em relações incompatíveis entre planta-patógeno (WARD et al., 1991).

Patógenos que não causam sintomas da doença na planta podem estar sujeitos ao reconhecimento na membrana plasmática das células das plantas, através dos *PAMPs/MAMPs* ativando respostas de defesa (NÜRNBERGER; LIPKA, 2005). Esse reconhecimento pode ser observado com a expressão dos genes *EIX1* e *Ve1* nos períodos iniciais analisados (48 e 72 h), sugerindo que produtos fúngicos poderiam ser elicitores de respostas de defesa.

Nesse contexto, observou-se que as diferenças entre interações compatíveis e incompatíveis se dão de forma quantitativa e cinética, sendo que os genes ativados podem ser similares e os mecanismos de sinalização de respostas de defesa amplamente compartilhados. Diferenças no período de ativação de determinada resposta de defesa e a amplitude dessa resposta pode ser crucial na determinação na resistência a um patógeno específico, visto que em alguns casos, se a indução de expressão de determinado gene é reduzida em algum momento da resposta de defesa, é necessário mais tempo para proteína codificada por esse gene se acumular, consequentemente, a resposta mediada por essa proteína mostra-se mais lenta, podendo acarretar na susceptibilidade da planta a doença (TAO et al., 2003).

Em suma, a indução dos genes relacionados à defesa no período de 48 h e a permanência dessa expressão no período de 72 horas após a inoculação concomitante ao aumento no nível de transcritos dos genes avaliados, pode ter tido papel fundamental na resistência das plantas de ‘Micro-Tom’ ao fungo *M. perniciosa* do biótipo que atinge *T. cacao*.

5.12 Caracterização da expressão gênica da infecção por isolados do biótipo-S em *curl3*, *jai1*, *prosistemina* e *NahG*

Juntamente com os experimentos de inoculação de plantas de ‘Micro-Tom’ com *M. perniciosa* do biótipo-S, meristemas apicais dos mutantes hormonais *curl3* e *jai1* e dos transgênicos *prosistemina* e *NahG* também foram inoculados com basidiósporos e coletados após 48 e 120 horas da inoculação. Visto que nesses dois tempos de coleta as plantas ainda não apresentaram sintomas visíveis de hiperplasia e vassoura lateral, a coleta se fez de modo arbitrário. Para análise de expressão gênica, inicialmente foi feita a detecção do fungo *M. perniciosa* a partir da curva de desnaturação do produto de PCR específico com transcritos do gene *RpL35* conforme descrito anteriormente. As amostras positivas para presença do fungo foram então selecionadas para avaliação com seis genes selecionados, incluindo *PR1a*, *PR1b*, *AOC*, *OPR3*, *PIN-II2x* e *Pti5*. Para expressão diferencial dos genes-alvo, utilizou-se o programa REST 2009 comparando plantas inoculadas e não inoculadas nos dois tempos de avaliação. Os genes constitutivos *PPA*, *GAPDH* e *tubulina* foram escolhidos como referências na análise, baseada nas avaliações feitas pelo programa *GeNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002).

Na avaliação de expressão diferencial dos genes, o mutante *curl3* apresentou indução em três genes dos seis testados, com taxas acima de sete vezes para o gene *Pti5* nos dois períodos avaliados. Já nas análises com *PR1a* e *PR1b*, em 48 h a expressão relativa obteve valores acima de 50 vezes, passando para acima de 1000 vezes nas avaliações feitas em 120 h. O gene *PIN-II2x* foi regulado negativamente 48 h após a inoculação, e no período de 120 h não apresentou níveis significativos de expressão (Figura 36).

As avaliações feitas no mutante *jai1* determinaram altos valores de acúmulo de transcritos do gene *Pti5*, sendo 180 vezes mais expresso em relação ao controle 48 h pós-inoculação. Contudo, na análise subsequente (120 h), esse mesmo gene foi regulado negativamente. Os genes *PR1a* e *PR1b* apresentaram valores de expressão relativa acima de 100 vezes na avaliação feita em 48 horas da infecção fúngica, reduzindo significativamente esses valores para três vezes mais expressos que o controle no período de 120 h. O gene *PIN-II2x* foi fortemente reprimido na avaliação de 48 h, permanecendo sem acúmulo de transcritos 120 h após a inoculação (Figura 36).

O transgênico *prosistemina* apresentou altos níveis de expressão relativa dos genes *PR1a* (acima de 2000 vezes) e *PR1b* (acima de 4000 vezes) 48 horas após a inoculação com o fungo *M. perniciosa*. Na avaliação de 120 h, esses índices caíram para cerca de 100 vezes mais expresso que o controle. O gene *PIN-II2x* manteve nos dois períodos avaliados valores de indução cinco vezes mais que o controle. Já o gene *Pti5* apresentou acúmulo significativo de transcritos (acima de 19 vezes) apenas no primeiro período de análise (Figura 36).

Na análise de expressão relativa com o transgênico *NahG* quatro genes foram ativados no período de 48 h após a inoculação, com destaque para *PR1a* e *PR1b* com níveis altíssimos de transcritos (acima de 3000 vezes). *Pti5* e *PIN-II2x* também apresentaram valores representativos, com sete vezes acima do controle não inoculado. Os genes *AOC* e *OPR3* foram regulados negativamente 48 e 120 horas após a inoculação e os genes *PIN-II2x* e *Pti5* foram negativamente regulados apenas nas avaliações realizadas 120 h após a inoculação. Os genes *PR1a* e *PR1b* apesar de não serem reprimidos 120 h da inoculação, não demonstraram valores significativos de indução (Figura 36).

Figura 36 - Análise da expressão diferencial dos genes *AOC*, *OPR3*, *PIN-II2x*, *Pti5*, *PR1a* e *PR1b* nos ápices vegetativos de plantas de 'Micro-Tom', dos mutantes *curl3* e *jai1* e dos transgênicos *prosistemina* e *NahG* inoculados com fungo *M. perniciosa* do biótipo-S nas coletas com 48 h e 120 h. A expressão relativa foi calculada pelo programa REST a partir dos valores de Ct determinado por RT-PCR quantitativo em tempo real, tendo como normalizadores os genes *PPA*; *GAPDH* e *tubulina*

O mutante com baixa sensibilidade a brassinoesteróide demonstrou uma sutil redução na susceptibilidade (com uma taxa de infecção de 60%) quando comparado às plantas de 'Micro-Tom' inoculadas para a doença vassoura-de-bruxa. Assim como MT, os genes

AOC, *OPR3* e *PIN-II2x* não apresentaram valores significativos de expressão gênica e os genes *Pti5*, *PR1a* e *PR1b* foram induzidos nos dois períodos de avaliação. Contudo os maiores valores de acúmulo de transcritos ocorreram no período de 120 h, o que caracteriza uma resposta de defesa tardia, não significando grandes interferências no desenvolvimento da doença vassoura-de-bruxa quando comparado ao controle ‘Micro-Tom’, ao se observar a caracterização sintomatológica em ambos os genótipos.

Diferentemente do mutante *jai1*, as plantas transgênicas *prosistemina* demonstraram redução no número de plantas com sintomas da vassoura-de-bruxa caracterização em relação ao controle ‘Micro-Tom’. O padrão de expressão entre os dois genótipos (*jai1* e *prosistemina*) foi similar, com uma resposta mais intensa no primeiro período de avaliação para os genes *Pti5*, *PR1a* e *PR1b*, porém o nível de transcritos acumulados no transgênico *prosistemina* foi quantitativamente maior do que no mutante *jai1*. Além disso, o que difere o transgênico da *prosistemina* do mutante *jai1* e da cultivar ‘Micro-Tom’ desafiadas com o fungo, é a expressão do inibidor de proteinase *PIN-II2x* nos dois períodos de avaliação (48 h e 120 h). Da mesma forma do que observado no transgênico *prosistemina* utilizado nas inoculações com *M. perniciosa*, plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. Better Boy) transgênicas expressando constitutivamente esse mesmo gene foi capaz de gerar sinalização sistêmica que induziu a síntese de inibidores de proteinases (MCGURL et al., 1994). Esses inibidores localizam-se nas paredes celulares, espaços intercelulares, citossol e vacúolos das plantas (KAPUR; TAN-WILSON; WILSON, 1989), podendo ser encontrados constitutivamente ou induzidos em resposta ao ataque de um patógeno ou de herbívoros (JONGSMA; BOLTER, 1997). O papel dos inibidores de proteinase pauta-se na atuação direta contra proteases extracelulares produzidas pelos patógenos que facilitam a penetração durante a infecção. Sendo assim, os inibidores retardam a proteólise das paredes celulares e de proteínas de membrana na tentativa de reduzir a desorganização celular. Inibidores de proteinases, como as chamadas cistatinas, também estavam expressos em bibliotecas de cDNA da interação entre *Theobroma cacao* e *M. perniciosa* (GESTEIRA et al., 2007). Cistatinas demonstraram ter papel na defesa contra o patógeno, visto que inibem a atividade das proteases produzidas pelo *M. perniciosa*, fazendo com que ocorra contenção no crescimento do micélio por dificultar a nutrição fúngica na planta (PIROVANI et al., 2010). Conjuntamente, esse inibidor de protease também parece controlar o desenvolvimento dos sintomas da morte celular programada, impedindo que a doença evolua para fase necrotrófica (PIROVANI et al., 2010).

O ácido salicílico desempenha papel crucial na ativação de respostas de defesa, sendo que a sinalização via esse fitohormônio está ligada diretamente a ativação de proteínas relacionadas à patogênese do grupo PR-1 (GAFFNEY et al., 1993). Surpreendentemente, os genes *PR1a* e *PR1b*, pertencentes ao grupo das PR-1, tiveram um grande acúmulo nos níveis de transcritos 48 horas após a inoculação com *M. perniciosa* nas plantas transgênicas *NahG*. Esse transgênico expressa o gene bacteriano salicilato hidroxilase (*nahG*) sendo deficiente no acúmulo do hormônio ácido salicílico (GAFFNEY et al., 1993). Do mesmo modo, trabalhos de inoculação com o patógeno *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (*Xcv*) em plantas transgênicas de tomate *NahG* também apresentaram acúmulo de transcritos dos genes *PR1a* e *PR1b*, 48 horas após a inoculação. Contudo a indução desses genes se deu apenas de modo local, não havendo a expressão gênica na forma sistêmica (BLOCK et al., 2005). Nas avaliações aqui realizadas, o material avaliado concentrou-se na região meristemática, ponto de inoculação do fungo *M. perniciosa*, e dessa forma a resposta de defesa avaliada foi fundamentalmente local, demonstrando que a indução das proteínas PR pode vir ser ativada localmente pelo patógeno, sendo que o hormônio AS possui o papel na sinalização da resposta de defesa na forma sistêmica.

Além da indução dos genes *PR1a* e *PR1b* pelo patógeno em uma resposta de defesa local, a ativação desses genes pode estar relacionado com a produção de ácido salicílico pelo fungo *M. perniciosa* (KILARU; BAILEY; HASENSTEIN, 2007), visto que a presença do fungo, através do gene *Rpl35* de *M. perniciosa*, foi detectada na planta nos dois períodos avaliados. Corroborando com a detecção da indução das PR-1, o fator de transcrição *Pti5* o qual regula a expressão das proteínas ligadas à patogênese (GU et al., 2002) também apresentou expressão apenas na avaliação de 48 h após a inoculação com o fungo. Da mesma forma que o transgênico *prosistemia*, a expressão do gene *PIN-II2x* foi observada 48 h após a infecção com o fungo *M. perniciosa*, sendo que ambos os genótipos transgênicos demonstraram uma menor susceptibilidade ao fungo *M. perniciosa*, podendo a expressão dessa proteinase específica contribuir para a contenção do crescimento fúngico. Além disso, sabe-se que a indução da expressão de inibidores de proteinase do tipo II se dá pela sinalização via JA (OROZCO-CARDENAS; MCGURL; RYAN, 1993), podendo associar a expressão do gene *PIN-II2x* a um aumento nos níveis desse hormônio.

6. CONCLUSÕES

- O tomateiro ‘Micro-Tom’ demonstrou ser um modelo genético adequado para o estudo da interação com *M. pernicioso*, com o desenvolvimento de sintomas característicos como a hipertrofia, hiperplasia e formação de vassouras laterais;
- A caracterização histopatológica da interação por microscópio óptico demonstrou evidente aumento no volume celular e desorganização das células nas plantas infectadas pelo fungo *M. pernicioso*;
- Por microscopia eletrônica de varredura verificou-se a germinação dos basidiósporos, com tubos germinativos longos e vigorosos, sem orientação específica e sem formação de apressório, com alguns pontos de penetração como tricoma, ferimento e diretamente através da epiderme;
- Por microscopia eletrônica de transmissão, observou-se a presença de hifas do *M. pernicioso* nos espaços intercelulares do córtex, as quais ficaram restritas a pequenas áreas nessa região;
- A partir das inoculações com os mutantes e plantas transgênicas com alterações nas vias de biossíntese ou percepção hormonal, constatou-se que a resistência à vassoura-de-bruxa pode estar atrelada a níveis elevados de jasmonato e por consequência, níveis reduzidos de ácido salicílico, visto o aumento da susceptibilidade (número de plantas sintomáticas) no mutante *jal*, e redução no número de plantas infectadas no *prosistemia* e *NahG*, sendo que os outros genótipos avaliados poderiam estar interferindo no balanço hormonal AS/JA de forma indireta;
- Não foi observada a infecção cruzada entre plantas de ‘Micro-Tom’, mutantes hormonais e plantas transgênicas com isolados do biótipo-C, contudo pode-se constatar retardo no desenvolvimento, com redução no diâmetro do caule e na altura das plantas inoculadas;

- A utilização do gene específico *Rpl35* de *M. pernicioso* permitiu detectar, por amplificação de transcritos reversos, a presença do fungo em tecidos infectados;
- A análise de expressão gênica com isolados do biótipo-S e -C revelam que as respostas de defesa na interação compatível e incompatível diferem de forma quantitativa e cinética, visto que em inoculações com o biótipo-S a resposta é mais intensa 48 h após a inoculação, e com o biótipo-C, com 72 h;
- A análise de expressão gênica dos transgênicos *NahG* e *prosystemina*, os quais foram menos susceptíveis a vassoura-de-bruxa, apresentou acúmulo de transcritos do inibidor de proteinase (*PIN-II2x*). Nos genótipos mais susceptíveis (*curl3* e *jai1*) esse gene não teve expressão significativa, demonstrando que possivelmente *PIN-II2x* tenha um papel importante na redução dos sintomas da doença.

REFERÊNCIAS

- ABRAMOVITCH, R.B.; MARTIN, G.B. Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. **Current Opinion on Plant Biology**, London, v. 7, p. 356-364, 2004.
- ACHUO, E.A.; AUDENAERT, K.; MEZIANE, H.; HOFTE, M. The salicylic acid-dependent defense pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. **Plant Pathology**, London, v. 53, p. 65-72, 2004.
- ADIE, B.A.; PEREZ-PEREZ, J.; PEREZ-PEREZ, M.M.; GODOY, M.; SANCHEZ SERRANO, J.J.; SCHMELZ, E.A.; SOLANO, R. ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defences in Arabidopsis. **Plant Cell**, Baltimore, v. 19, p. 1665–1681, 2007.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1997.
- AGUILAR, M.A.G.; BEZERRA, K.M.T.; RESENDE, M.L.V. e NOJOSA, G.B.A. Níveis de fenóis, atividade de peroxidases e polifeloxidases em tecidos foliares de clones de cacau resistentes e suscetíveis à *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 261, 1999. (Suplemento).
- AIME, M.C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, Lancaster, v. 97, p. 1012-1022, 2005.
- ANDEBRHAN, T.; FIGUEIRA, A.; YAMADA, M.M.; FURTEK, D.B. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, p. 167-175, 1999.
- ALBUQUERQUE, P.S.B.; BASTOS, C.N.; LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M. Doenças do cacauzeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN, A.F.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. Cap. 18, p. 151-163.
- ALBUQUERQUE, P.S.B.; SILVA, S.D.V.M.; LUZ, E.D.M.N.; PIRES, J.L.; VIEIRA, A.M.C.; DEMÉTRIO, C.G.B.; PASCHOLATTI, S.F.; FIGUEIRA, A. Novel sources of witches broom resistance (causal agent *Moniliophthora pernicioso*) from natural populations of *Theobroma cacao* from the Brazilian Amazon. **Euphytica**, Wageningen, v. 172, p. 125-138, 2010.
- AMBRÓSIO, A.B.; GARCÍA, O.C.; MILAGRE, H.M.S; PEREIRA, G.A.G. Avaliação da produção de giberelina pelo fungo *Moniliophthora pernicioso* causador da vassoura-de-bruxa. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 54., 2008, Salvador. **Resumos...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. p. 47.
- ANDERBRHAN, T.; HAMMERSTONE, J.F.; ROMANCZYK, L.J., FURTEK, D.B. Sensitivity of *Crinipellis pernicioso* to procyanidins from *Theobroma cacao* L. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, p. 339-348, 1995.

ANDRADE, C.G.; RESENDE, M.L.V.; CARVALHO, G.A.; ARAÚJO, A.G. Purificação de compostos do tipo fitoalexinas na interação *Crinipellis pernicioso* x Cacaueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 24, p. 262, 1999. (Suplemento).

ARIE, T.; TAKAHASHI, H.; KODAMA, M.; TERAOKA, T. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. **Plant Biotechnology**, Tokyo, v. 24, p. 135-47, 2007.

ARRUDA, M.C.C.; MILLER, R.N.G.; FERREIRA, M.A.S.V.; FELIPE, M.S.S. Comparison of *Crinipellis pernicioso* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. **Plant Pathology**, London, v. 52, p. 236-244, 2003.

ASSELBERGH, B.; ACHUO, A.E.; HOFTE, M.; VAN GIJSEGEN, F. Absciscic acid deficiency leads to rapid activation of tomato defence responses upon infection with *Erwinia chrysanthemi*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 9, p. 11-24, 2008.

ASSELBERGH, B.; DE VLEESSCHAUWER, D.; HÖFTE, M. Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 21, p. 709-719, 2008.

AUDENAERT, K.; DEMEYER, G.B.; HOFTE, M.M. Absciscic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. **Plant Physiology**, Rockville, v. 128, p. 491-501, 2002.

BALAJI, V.; MAYROSE, M.; SHERF, O.; JACOB-HIRSCH, J.; EICHENLAUB, R.; IRAKI, N.; MANULIS-SASSON, S.; RECHAVI, G.; BARASH, I.; SESSA, G. Tomato Transcriptional Changes in Response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Reveal a Role for Ethylene in Disease Developmental. **Plant Physiology**, Rockville, v. 146, p. 1797-1809, 2008.

BALLARÉ, C.L. Jasmonate-induced defenses: A tale of intelligence, collaborators and rascals. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 16, p. 249-257, 2011.

BARI, R.; JONES, J. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, p. 473-488, 2009.

BARROS, F.C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L.C.C.; JULIATTI, F.C. Indução de resistência em plantas a fitopatógenos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 3, p. 231-239, 2010.

BARRY, C.S.; FOX, E.J.; YEN, H.; LEE, S.; YING, T.; GRIERSON, D.; GIOVANNONI, J.J. Analysis of the ethylene response in the *epinastic* mutant of tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 58-66, 2001.

BARTLEY, B.G.D. Cacao, *Theobroma cacao*. **FAO Plant Production and Protection Paper**, Rome, v. 70, p. 25-42, 1986.

BASTOS, C.N.; ANDEBRHAN, T. Presença de giberelina em basidiósporos de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 6, 417-423, 1981.

BASTOS, C.N.; ANDEBRHAN, T. Urucum *Bixa orellana* a new host of witches' broom disease *Crinipellis pernicioso* of cocoa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 11, p. 963–965, 1986.

BASTOS, C.N.; ANDEBRHAN, T.; DE ALMEIDA, L.C. Comparações morfológica e patológica de *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 13, p. 202–206, 1988.

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

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

BLOCK, A.; SCHMELZ, E.; O'DONNELL, P.J.; JONES, J.B.; KLEE, H.J. Systemic Acquired Tolerance to Virulent Bacterial Pathogens in Tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 138, p. 1481–1490, 2005.

BOLLER, T. Chemoperception of microbial signals in plant cells. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 46, p. 189–214, 1995.

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

BRADLEY, D.J.; KJELLBOM, P.; LAMB, C.J. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. **Cell**, Cambridge, v. 70, p. 21–30, 1992.

BRODY, J. R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, Natick, v. 36, p. 214–216, 2004.

BROEKAERT, W.F.; DELAURE, S.L.; de BOLLE, M.F.C.; CAMMUE, B.P.A. The role of ethylene in host-pathogen interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 393–416, 2006.

BURBIDGE, A.; GRIEVE, T.M.; JACKSON, A.; THOMPSON, A.; MCCARTY, D.R.; TAYLOR, I.B. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize *Vp14*. **Plant Journal**, Oxford, v. 17, p. 427–431, 1999.

CAMPOS, M.L.; PERES, L.E.P. Brassinosteroids as mediators of plant biotic stress responses. In: PEREIRA-NETTO, A.B. (Org.). **Brassinosteroids: practical applications in agriculture and human health**. Sharjah: Bentham Science Publishers, 2012. v. 1, p. 35–43.

CAMPOS, M.L.; de ALMEIDA, M.; ROSSI, M.L.; MARTINELLI, A.P.; LITHOLDO, C.G.; FIGUEIRA, A.; RAMPELOTTI-FERREIRA, F.T.; VENDRAMIM, J.D.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Brassinosteroids interact negatively with jasmonates in the formation of anti-herbivory traits in tomato. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 4347–4361, 2009.

CAMPOS, M.L.; CARVALHO, R.F.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Small and remarkable the Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 5, p. 267-270, 2010.

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

CHAVES, F.C.; GIANFAGNA, T.J. Necrotrophic phase of *Moniliophthora perniciosa* causes salicylic acid accumulation in infected stems of cacao. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 69, p. 104-108, 2006.

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

CHOI, J.; CHOI, D.; LEE, S.; RYU, C.; HWANG, I. Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 16, p. 388-394, 2011.

DANGL, J.L.; JONES, J.D. Plant pathogens and integrates defense responses to infection. **Nature**, London, v. 411, p. 826-833, 2001.

DE ARRUDA, M.C.C.; SEPULVEDA, G.F.; MILLER, R.N.G.; FERREIRA, M.A.S.V.; SANTIAGO, D.V.R.; RESENDE, M.L.V.; DIANESE, J.C.; FELIPE, M.S.S. *Crinipellis brasiliensis*, a new species based on morphological and molecular data. **Mycologia**, Lancaster, v. 97, p. 1348–1361, 2005.

DE TORRES-ZABALA, M.; TRUMAN, W.; BENNETT, M. H.; LAFFORGUE, G.; MANSFIELD, J. W.; RODRIGUEZ EGEA, P.; BOGRE, L.; GRANT, M. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. **European Molecular Biology**, Heidelberg, v. 26, p. 1434-1443, 2007.

DE VOS, M.; VAN OOSTEN, V. R.; VAN POECKE, R. M.; VAN PELT, J. A.; POZO, M. J.; MUELLER, M. J.; BUCHALA, A. J.; MÉTRAUX, J. P.; VAN LOON, L. C.; DICKE, M.; PIETERSE, C. M. Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, p. 923-937, 2005.

DELANEY, T. P.; UKNESS, S.; VERNOOIJ, B.; FRIEDRICH, L.; WEYMANN, K.; NEGROTTO, N.; GAFFNEY, T.; GUT-RELLA, M.; KESSMANN, H.; WARD, E.; RYALS, J. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. **Science**, Washington, v. 266, p. 1247-1250, 1994.

DEVOTO, A.; TURNER, J. G. Jasmonate-regulated *Arabidopsis* stress signalling network. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 123, p. 161–172, 2005.

DIAS, L. A. S. **Melhoramento genético do cacaueiro**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2001. 578 p.

DIAZ, J.; TEN HAVE, A.; VAN KAN, J. A. L. The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, p. 1341–1351, 2002.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 185-209, 2004.

ELAD, Y. Production of ethylene by tissue of tomato, pepper, French-bean and cucumber in response to infection by *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 36, p. 277-287, 1990.

EVANS, H. C. Witches' Broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*) in Ecuador. 1. The fungus. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 89, p. 185-192, 1978.

EVANS, H. C. Uma reavaliação do ciclo de vida da vassoura de bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacau. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, p. 104-109, 1979.

EVANS, H. C. Witche's Broom disease: a case study. **Cocoa Grower's Bulletin**, v. 32, p. 5-19, 1981.

FEYS, B. J.; PARKER, J. E. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 16, p. 449-455, 2000.

FIGUEIRA, A.; ALEMANNO, L. *Theobroma cacao* Cacao. In: LITZ, R. E. **Biotechnology of fruit and nut crops**, Gainesville, CABI, 2005. p. 639-669.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 9, p. 275-296, 1971.

FONSECA, S. E. A.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Avaliação de clones de cacau na Amazônia brasileira em relação a incidência de vassoura-de-bruxa. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12, 2000, Salvador, Bahia. **Proceedings...** Lagos, Nigeria: Cocoa Producers' Alliance, 2000. 1 CD-ROM.

FRADIN, E. F.; THOMMA, B. P. H. J. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahlia* and *V. albo-atrum*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 7, p. 71-86, 2006.

FRIAS, G. A.; PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Infection biology of *Crinipellis perniciosa* on vegetative flushes of cacao. **Plant Disease**, v. 7, p. 552-556, 1991.

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

GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; NEGROTTO, D.; NYE, G.; UKNES, S.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science**, London, v. 261, p. 754–756, 1993.

GARCIA, O.; MACEDO, J. A.; TIBURCIO, R.; ZAPAROLE, G.; RINCONES, J.; BITTENCOURT, L. M.; CEITA, G. O.; MICHELI, F.; GESTEIRA, A.; MARIANO, A. C.; SCHIAVINATO, M. A.; MEDRANO, F. J.; MEINHARDT, L. W.; PEREIRA, G. A.; CASCARDO, J. C. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, Oxford, v. 111, p. 443–455, 2007.

GERAATS, B. P. J.; BAKKER, P. A. H. M.; LAWRENCE, C. B.; ACHUO, E. A.; HÖFTE, M.; VAN LOON, L. C. Ethylene-insensitive tobacco shows differentially altered susceptibility to different pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 813–82, 2003.

GERAATS, B. P. J.; BAKKER, P. A. H. M.; VAN LOON, L. C. Ethylene insensitivity impairs resistance to soilborne pathogens in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, p. 1078–1085, 2002.

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

GLAZEBROOK, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 205–227, 2005.

GODA, H.; SASAKI, E.; AKIYAMA, K.; MARUYAMA-NAKASHITA, A.; NAKABAYASHI, K.; LI, W.; OGAWA, M.; YAMAUCHI, Y.; PRESTON, J.; AOKI, K.; KIBA, T.; TAKATSUTO, S.; FUJIOKA, S.; ASAMI, T.; NAKANO, T.; KATO, H.; MIZUNO, T.; SAKAKIBARA, H.; YAMAGUCHI, S.; NAMBARA, E.; KAMIYA, Y.; TAKAHASHI, H.; HIRAI, M. Y.; SAKURAI, T.; SHINOZAKI, K.; SAITO, K.; YOSHIDA, S.; SHIMADA, Y. The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. **Plant Journal**, Oxford v. 55, p. 526–542, 2008.

GÖHRE, V.; ROBATZEK, S. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 46, p. 189–215, 2008.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis perniciosa*. **Heredity**, Hampshire, v. 72, p. 278–289, 1994.

GRIFFITH, G. W.; BRAVO-VELASQUEZ, E.; WILSON, F. J.; LEWIS, D. M.; HEDGER, J. N. Autecology and evolution of the Witches' Broom pathogen (*Crinipellis perniciosa*) of cocoa. In: BLAKEMAN, J. P.; WILLIAMSON, B. (Eds.). **Ecology of plant pathogens**, Oxford: British Society for Plant Pathology, 1994. chap. 15, p. 245–267,

GU, Y. Q., WILDERMUTH, M. C., CHAKRAVARTHY, S., LOH, Y. T.; YANG, C.; HE, X.; HAN, Y.; MARTIN, G. B. Tomato transcription factors Pti4, Pti5, and Pti6 activate

defense responses when expressed in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Oxford, v. 14, p. 817–831, 2002.

GUIMARÃES, R. L.; STOTZ, H. U. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, p. 3703–3711, 2004.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Rockville, American Society of Plant Physiologists, p.1102–1156, 2000.

HAY, A.; TSIANTIS, M. KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity. **Development**, v. 137, p. 3153–3165, 2010.

HICKS, G. R.; RAYLE, D. L.; LOMAX, T. L. The diageotropica mutant of tomato lacks high specific activity auxin binding sites. **Science**, London, v. 245, p. 52–54, 1989.

HOU, X.; LEE, L. Y.; XIA, K.; YAN, Y.; YU, H. DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. **Developmental Cell**, Amsterdam, v. 19, p. 884–894, 2010.

JACOBS, A. K.; DRY, I. B.; ROBINSON, S. P. Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with Ethepon. **Plant Pathology**, London, v. 48, p. 325–336, 1999.

JAMESON, P. Cytokinins and auxins in plant–pathogen interactions: an overview. **Plant Growth Regulation**, Berlin, v. 32, p. 369–380, 2000.

JONES, J. D.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, London, v. 444, p. 323–329, 2006.

JONGSMA, M. A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, Amsterdam, v. 43, p. 885–895, 1997.

KAMOUN, S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 41–60, 2006.

KAPUR, R.; TAN-WILSON, A. L.; WILSON, K. A. Isolation and partial characterization of subtilisin inhibitor from mung bean (*Vigna-radiata*). **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, p. 106–112, 1989.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137–238, 1965.

KAWANO, T. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, p. 829–837, 2003.

KAWCHUK, L. M.; HACHEY, J.; LYNCH, D. R.; KULCSAR, F.; VAN ROOIJEN, G.; WATERER, D. R.; ROBERTSON, A.; KOKKO, E.; BYERS, R.; HOWARD, R. J.; FISCHER, R.; PRUFER, D. Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like

receptors. **The Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 98, p. 6511-6515, 2001.

KAZAN, K.; MANNERS, J. M. JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, p. 22–31, 2012.

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

KILARU, A.; HASENSTEIN, K. H. Development and pathogenicity of the fungus *Crinipellis perniciosa* on interaction with cacao leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, p. 101-107, 2005.

KLEE, H. J.; ESTELLE, M. Molecular genetic approaches to plant hormone biology. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 529-551, 1991.

KOGA, H.; DOHI, K.; MORI, M. Absciscic acid and low temperatures suppress the whole plant-specific resistance reaction of rice plants to the infection of *Magnaporthe grisea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 65, p. 3-9, 2004.

KOKA, C. V.; CERNY, R. E.; GARDNER, R. G.; NOGUCHI, T.; FUJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; YOSHIDA, S.; CLOUSE, S. D. A putative role for the tomato genes *DUMPY* and *CURL-3* in brassinosteroid biosynthesis and response. **Plant Physiology**, Rockville, v. 2, p. 85-98, 2000.

KOORNNEEF, A.; PIETERSE, C. M. J. Cross talk in defense signaling. **Plant Physiology**, Rockville, v. 146, p. 839–844, 2008.

KOORNNEEF, M.; ALONSO-BLANCO, C.; PEETERS, A. J. M. Genetic approaches in plant physiology. **New Phytologist**, New York, v. 137, p. 1-8, 1997.

KOORNNEEF, M.; BOSMA, T. D. G.; HANHART, C. J.; VAN DER VEEN, J. H.; ZEEVAART, J. A. D. The isolation and characterization of gibberellins-deficient mutants in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 80, p. 852-857, 1990.

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

LAKER, H. A.; SREENIVASAN, T. N.; KUMAR, D. R. Investigation on the histopathology of cocoa seedlings infected with *Crinipellis perniciosa* in Trinidad. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 3, p. 129-137, 1991.

LANA, T. G. **Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis perniciosa***. 2004. 106 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

LEAL JUNIOR, G. A. **Avaliação da expressão de genes de *T. cacao* e *C. perniciosa* associados a resistência e patogenicidade no período assintomático da doença vassoura-de-bruxa.** 2006. 124 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

LEAL JUNIOR, G. A.; GOMES, L. H.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; TAVARES, F. C. A.; FIGUEIRA, A. V. O. Searching for *Moniliophthora perniciosa* pathogenicity genes. **Fungal Genetics and Biology**, Amsterdam, v. 1, p. 1-13, 2010.

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

LEIVAR, P.; QUAIL, P. H. PIFs: pivotal components in a cellular signalling hub. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 16, p. 19-28, 2011.

LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.; LAMB, C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, Maryland Heights, v.79, p. 583-593, 1994.

LI, A.; HEATH, M. C. Effect of plant growth regulators on the interaction between bean plants and rust fungi non-pathogenic on beans. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 37, p. 245-254, 1990.

LI, L.; ZHAO, Y.; MCCAIG, B. C; WINGERD, B. A.; WANG, J.; MARK, E. W.; PICHERSKY, E.; HOWE, G. A. The tomato homolog of Coronatine-insensitive1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. **Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. 126-143, 2004.

LI, L.; LI, C.; HOWE, G. A. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 99, p. 6416-6421, 2002.

LI, L.; LI, C.; HOWE, G. A. Genetic analysis of wound signaling in tomato. Evidence for a dual role of jasmonic acid in defense and female fertility. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 1414-1417, 2001.

LIPKA, U.; FUCHS, R.; LIPKA, V. *Arabidopsis* non-host resistance to powdery mildews **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, p. 404-411, 2008.

LITHOLDO JUNIOR, C. G. **Identificação e expressão de genes da biossíntese do jasmonato na interação entre *Theobroma cacao* e *Moniliophthora perniciosa*.** 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

LOPES, J. R. M.; LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L. Suscetibilidade do cupuaçuzeiro e outras espécies vegetais a isolados de *Crinipellis perniciosa* obtidos de quatro hospedeiros diferentes no sul da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 601-605, 2001.

LORENZO, O.; PIQUERAS, R.; SÁNCHEZ-SERRANO, J. J.; SOLANO, R. ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. 165-178, 2003.

LORENZO, O.; SOLANO, R. Molecular players regulating the jasmonate signaling network. **Current Opinion in Plant Biology**, Cambridge, v. 8, p. 532-540, 2005.

LOVDAL, T.; LILLO, C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v. 387, p. 238-242, 2009.

LUND, S. T.; STALL, R. E.; KLEE, H. J. Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. **Plant Cell**, Baltimore, v. 10, p. 371-382, 1998.

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

MARTÍ, E.; GISBERT, C.; BISHOP, G.J.; DIXON, M. S.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J. L. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 2037-2047, 2006.

MATHEWS, H.; CLENDENNEN, S. K.; CALDWELL, C. G.; LIU, X. L.; CONNORS, K.; MATHEIS, N.; SCHUSTER, D. K.; MENASCO, D. J.; WAGONER, W.; LIGHTNER, J.; WAGNER, D. R. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. **Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 1689-1703, 2003.

McCOURT, P. Genetic analysis of hormone signaling. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 219-243, 1999.

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

McGURL, B.; PEARCE, G.; OROZCO-CARDENAS, M.; RYAN, C. A. Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. **Science**, Washington, v. 255, p. 1570-1573, 1992.

MEINHARDT, L. W.; BELLATO, C. D.; RINCONES, J.; AZEVEDO, R. A.; CASCARDO J. C. M.; PEREIRA, G. A. G. In vitro Production of biotrophic-Like cultures of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Current Microbiology**, New York, v. 52, n.3, p. 191-196, 2006.

MEISSNER, R.; CHAGUE, V.; ZHU, Q.; EMMANUEL, E.; ELKIND, V.; LEVY, A. A. A high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. **Plant Journal**, New York, v. 22, p. 265-274, 2000.

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

MEJÍA, L. C.; ROJAS, E.; MAYNARD, Z.; VAN BAEL, S.; ARNOLD, A. E.; HEBBAR, P.; SAMUELS, G. J.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 4-14, 2008.

MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; KOCZAN, J.; NOMURA, K.; HE, S.Y. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. **Cell**, Maryland Heights, v. 126, p. 969-980, 2006.

MOHR, P. G.; CAHILL, D. M. Relative roles of glyceollin, lignin and the hypersensitive response and the influence of ABA in compatible and incompatible interactions of soybeans with *Phytophthora sojae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 58, p.31-41, 2001.

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

MONTOYA, T.; NOMURA, T.; FARRAR, K.; KANETA, T.; YOKOTA, T.; BISHOP, G. J. Cloning the tomato *Curl3* gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling. **Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. 3163-3176, 2002.

MUESSIG, C.; LISSO, J.; COLL-GARCIA, D.; ALTMANN, T. Molecular analysis of brassinosteroid action. **Plant Biology**, New York, v. 8, p. 291-296, 2006.

MUR, L. A. J.; KENTON, P.; ATZORN, R.; MIERSCH, O.; WASTERACK, C.. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 249-262, 2006.

MURPHY, A. M.; PRYCE-JONES, E.; JOHNSTONE, K.; ASHBY, A. M. Comparison of cytokinin production in vitro by *Pyrenopeziza brassicae* with other plant pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 50, p. 53-65, 1997.

MYSORE, K. S.; RYU, C. M. Nonhost resistance: how much do we know? **Plant Science**, Amsterdam, v. 9, p. 97-104, 2004.

NAGPAL, P.; ELLIS, C. M.; WEBER, H.; PLOENSE, S. E.; BARKAWI, L. S.; GUILFOYLE, T. J.; HAGEN, G.; ALONSO, J. M.; COHEN, J. D.; FARMER, E. E.; ECKER, J. R.; REED, J. W. Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. **Development**, Cambridge, v. 132, p. 4107–4118, 2005.

NAKAGAWA, S.; TJOKROKUSUMO, D.; SAKURAI, A.; YAMAGUCHI, I.; TAKAHASHI, N.; SYONO, K. Endogenous levels of gibberellins, IAA and cytokinins in tobacco crown gall tissues of different morphologies. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 28, p. 485–493, 1987.

NAKASHITA, H.; YASUDA, M.; NITTA, T.; ASAMI, T.; FUJIOKA, S.; ARAI, Y.; SEKIMATA, K.; TAKATSUTO, S.; YAMAGUCHI, I.; YOSHIDA, S. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. **Plant Journal**, New York, v. 33, p. 887–898, 2003.

NARASIMHAN, M. L.; LEE, H.; DAMSZ, B.; SINGH, N. K.; IBEAS, J. I.; MATSUMOTO, T. K.; WOLOSHUK, C. P.; BRESSAN, R. A. Overexpression of a cell wall glycoprotein in *Fusarium oxysporum* increases virulence and resistance to a plant PR-5 protein. **Plant Journal**, Oxford, v. 36, p. 390–400, 2003.

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

NOMURA, K.; MELOTTO, M.; HE, S. Y. Suppression of host defense in compatible plant *Pseudomonas syringae* interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 8, p. 361–368, 2005.

NÜRNBERGER, T.; LIPKA, V. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 6, p. 335–345, 2005.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D. V. Cytology and physiology of infection of *P. vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Plant Pathology**, London, v. 27, p. 75–98, 1985.

O'DONNELL, P. J.; CALVERT, C.; ATZORN, R.; WASTERACK, C.; LEYSER, H. M. O.; BOWLES, D. J. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. **Science**, London, v. 274, p. 1914–1917, 1996.

O'DONNELL, P. J.; SCHMELZ, E.; BLOCK, A.; MIERSCH, O.; WASTERACK, C.; JONES, J. B.; KLEE, H. J. Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense response. **Plant Physiology**, Oxford, v. 133, p. 1181–1189, 2003.

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

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

ORI, N.; JUAREZ, M.T.; JACKSON, D.; YAMAGUCHI, J.; BANOWETZ, G.M.; HAKE, S. Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene knotted1 under the control of a senescence-activated promoter. **Plant Cell**, Baltimore, v. 11, p. 1073-1080, 1999.

OROZCO-CARDENAS, M.; MCGURL, B.; RYAN, C. A. Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. **The Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 90, p. 8273-8276, 1993.

PARK, S-W.; KAIMOYO, E.; KUMAR, D.; MOSHER, S.; KLESSIG, D. F. Methyl Salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. **Science**, London, v. 318, p. 113-116, 2007.

PAUWELS, L.; INZE, D.; GOOSSENS, A. Jasmonate-inducible gene: what does it mean? **Trends in Plant Sciences**, Amsterdam, v. 14, p. 87-91, 2009.

PEÑA-CORTÉS, H.; ALBRECHT, T.; PRAT, S.; WEILER, E. W.; WILLMIRZER, L. Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. **Planta**, Berlin, v. 191, p. 123-128, 1993.

PEÑA-CORTÉS, H.; FISAHN, J.; WILLMITZER, L. Signals involved in wound-induced Pin2 gene expression in tomato and potato plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 92, p. 4106-4113, 1995.

PERFECT, S. E.; HUGHES, H. B.; OCONNELL, R. J.; GREEN, J. R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Amsterdam, v. 27, p. 186-198, 1999.

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

PIETERSE, C. M. J.; VAN LOON, L. C. Npr1: the spider in the web of induced resistance signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, Cambridge, v. 7, p. 456-464, 2004.

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

PIROVANI, C. P.; SILVA, A. S.; MICHELI, F.; MARGIS, R.; SILVA, G. A.; ALVIM, F. C.; PEREIRA, G. A. G.; CASCARDO, J. C. M. *Theobroma cacao* cystatins impair *Moniliophthora perniciosa* mycelial growth and are involved in postponing cell death symptoms. **Planta**, Berlin, v. 232, p. 1485-1497, 2010.

POZO, M. J.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. J. Jasmonates-signals in plant-microbe interactions. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 23, p. 211–222, 2005.

PRÉ, M.; ATALLAH, M.; CHAMPION, A.; DE VOS, M.; PIETERSE, C. M. J.; MEMELINK, J. The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. **Plant Physiology**, Oxford, v. 147, p. 1347–1357, 2008.

PROM, L.; EGILLA, J. Effect of chitinase and thaumatin on mycelial growth of five sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] grain molding fungi under in vitro conditions. **Journal of Tropical Agriculture**, Kerala, v. 49, p. 88-90, 2011.

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

REIGNAULT, P.; SANCHOLLE, M. Plant-pathogen interactions: will the understanding of common mechanisms lead to the unification of concepts? **Compte Rendus Biologies**, Amsterdam, v. 328, p. 821-833, 2005.

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

RESENDE, M. L.V; BEZERRA, J. L. *Crinipellis pernicios*a de um novo hospedeiro (*Solanum stipulaceum*) induzindo reação de hipersensibilidade em *Theobroma cacao*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 405 (Supl.), 1996.

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

ROJO, E.; TITARENKO, E.; LEON, J.; BERGER, S.; VANCANNEYT, G., SANCHEZ-SERRANO, J. J. Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 13, p. 153-165, 1998.

RON, M.; AVNI, A. The receptor for the fungal elicitor Ethylene-Inducing Xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. **Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. 1604-1615, 2004.

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

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

SCHAFFRATH, U., FREYDL, E.; DUDLER, R. Evidence for different signaling pathways activated by inducers of acquired resistance in wheat, **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 10, p. 779–783, 1997.

SCHENK, P. M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J. P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S. C.; MANNERS, J. M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, p.11655-11660, 2000.

SCOTT, J.; HARBAUGH, B. Micro-Tom: a miniature dwarf tomato. **Florida Agricultural Experiment Stations Circular**, Gainesville, v. 370, p. 1-6, 1989.

SENA-GOMES, A. R.; ROCHA, S. B. 1995. Caracterização estomática em folhas de diferentes genótipos de cacau. **Informe Técnico**, Ilhéus, p. 59-60, 1991.

SILVA, S. D. V. M.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Crinipellis pernicioso* em cacaueiros suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 54-59, 1999.

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

SINGER, R. A monographic study of the genera “*Crinipellis*” and “*Chaetocalathus*.” **Lilloa**, Tucumán, v. 8, p. 441-534, 1942.

SMITH, J. L.; DE MORAES, C. M.; MESCHER, M. C. Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. **Pest Management Science**, v. 65, p. 497-503, 2009.

SPOEL, S. H.; DONG, X. Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. **Cell Host Microbe**, Berlin, v. 3, p. 348-351, 2008.

SPOEL, S. H.; KOORNNEEF, A.; CLAESSENS, S. M.; KORZELIUS, J. P.; VAN PELT, J. A.; MUELLER, M. J.; BUCHALA, A. J.; MÉTRAUX, J. P.; BROWN, R.; KAZAN, K.; VAN LOON, L. C.; DONG, X.; PIETERSE, C. M. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. **Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 760-770, 2003.

SREENIVASAN, T. N.; DABYDEEN, S. Modes of penetration of young cocoa leaves by *Crinipellis pernicioso*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 3, n. 6, p. 478-481, 1989.

STAHEL, G. *Marasmius perniciosus* Nov. Spec., the cause of the krulloten disease of cacao in Suriname. Transl. AMW ter Laag, **Surinam. Bulletin Department Van den Landbouw**, Paramaribo, n. 25, p. 25, 1915 (Translated from German).

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-270, 1997.

STRATMANN, J. W. Long distance run in the wound response-jasmonic acid is pulling ahead. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 8, p. 247-250, 2003.

SUN, T. P.; GLUBER, F. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 197-223, 2004.

SYMONS, G. M.; ROSS, J. J.; JAGER, C. E.; REID, J. B. Brassinosteroid transport. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, p. 17-24, 2008.

TABATA, R.; IKEZAKI, M.; FUJIBE, T.; AIDA, M.; TIAN, C.E.; UENO, Y.; YAMAMOTO, K. T.; MACHIDA, Y.; NAKAMURA, K.; ISHIGURO, S. Arabidopsis auxin response factor6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class 1 KNOX genes. **Plant Cell Physiology**, v. 51, p. 164-175, 2010.

TAMHANE, V. A.; GIRI, A. P.; KUMAR, P.; GUPTA, V. S. Spatial and temporal expression patterns of diverse Pin-II proteinase inhibitor genes in *Capsicum annum* Linn. **Gene**, Amsterdam, v. 442, p. 88-98, 2009.

TAO, Y.; XIE, Z.; CHEN, W.; GLAZEBROOK, J.; CHANG, H. S.; HAN, B.; ZHU, T.; ZOU, G.; KATAGIRI, F. Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. **Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 317-330, 2003.

TAYLOR, I. B.; BURBIDGE, A.; THOMPSON, A. J. Control of abscisic acid synthesis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 1563-1574, 2000.

THALER, J.; BOSTOCK, R. Interactions between abscisic-acid-mediated responses and plant resistance to pathogens and insects. **Ecology**, Washington, v. 85, p. 48-58, 2004.

THALER, J. S.; OWEN, B.; HIGGINS, V. J. The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, p. 530-538, 2004.

THOMMA B. P.H.J.; VAN ESSE, H.P.; CROUS, P.W.; DE WIT, P.J.G.M. *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 6, p. 379-393, 2005.

THOMMA, B. P.; PENNINCKX, I. A.; BROEKAERT, W. F.; CAMMUE, B. P. The complexity of disease signaling in Arabidopsis. **Current Opinion in Immunology**, Amsterdam, v.1 3, p. 63-68, 2001.

TOVAR, G. La investigación sobre la epidemiología de la escoba de bruja del cacao [*Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer] en el piedemonte llanero de Colombia: consideraciones generales. **Agronomía Colombiana**, Bogotá, v. 8, p. 31-40, 1991.

TSAVKELOVA, E.; KLIMOVA, S.; CHERDYNTSEVA, T.; NETRUSOV, A. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Berlin, v. 42, p. 117-126, 2006.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 135-162, 2006.

VAN LOON, L. C. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: Datta, S. K.; Muthukrishnan, S., (Eds.). **Pathogenesis related proteins in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1999. p. 1-19.

VAN LOON, L. C.; GERAATS, B. P. J.; LINTHORST, H. J. M. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 11, p. 184-191, 2006.

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

VAN WEES, S. C.; GLAZEBROOK, J. Loss of non-host resistance of *Arabidopsis NahG* to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid. **Plant Journal**, Oxford, v. 33, p. 733-742, 2003.

VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Plant Pathology**, Palo Alto, v. 18, p. 259-288, 1980.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, reserach0034-1-34-11, 2002.

VERICA, J. A.; MAXIMOVA, S. N.; STREM, M. D.; CARLSON, J. E.; BAILEY, B. A.; GUILTINAN, M. J. Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. **Plant Cell Reports**, New York, v. 23, p. 404-413, 2004.

VIDHYSEKARAN, P. **Physiology of disease resistance in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1988. v. 1, p. 149.

VIJAYAN, P.; SHOCKEY, J.; LEVESQUE, C. A.; COOK, R. J.; BROWSE, J. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, p. 7209-7214, 1998.

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

WARD, E. R.; UKNES, S. J.; WILLIAMS, S. C.; DINCHER, S. S.; MIEDERHOLD, D. J.; ALEXANDER, D. C.; AHL HOY, P.; MÉTRAUX, J. P.; RYALS, J. A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **Plant Cell**, Baltimore, v. 3, p. 1085-1094, 1991.

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

WU, G.; SHORTT, B. J.; LAWRENCE, E. B.; LEVINE, E. B.; FITZSIMMONS, K. C.; SHAH, D. M. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. **Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 1357-1368, 1995.

XU, Y.; CHANG, P. F.; LIU, D.; NARASIMHAN, M. L.; RAGHOTHAMA, K. G.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Plant defense genes are synergically induced by ethylene and methyl jasmonate. **Plant Cell**, Baltimore, v. 6, p. 1077-1085, 1994.

YAMADA, M. M.; ANDERBRAHN, T.; FURTEK, D. B. Genetic variability among isolates of *Crinipellis pernicioso* from solanaceous hosts and their relationship to isolates from *Theobroma cacao*. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 10, p. 123-126, 1998.

YAN, Y.; STOLZ, S.; CHÉTELAT, A.; REYMOND, P.; PAGNI, M.; DUBUGNON, L.; FARMER, E. E. A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. **Plant Cell**, Baltimore, v. 19, p. 2470-2483, 2007.

YI, H. C.; JOO, S.; NAM, K. H.; LEE, J. S.; KANG, B. G.; KIM, W. T. Auxin and brassinosteroid differentially regulate the expression of three members of the 1 aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in mung bean (*Vigna radiata* L.). **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 41, p. 443-454, 1999.

ZHANG, S.; CAI, Z.; WANG, X. The primary signaling outputs of brassinosteroids are regulated by abscisic acid signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 106, p. 4543-4548, 2009.

ZIADI, S.; POUPARD, P.; BRISSET, M. N.; PAULIN, J. P.; SIMONEAU, P. Characterization in apple leaves of two subclasses of PR-10 transcripts inducible by acibenzolar-S-methyl, a functional analogue of salicylic acid. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, p. 33-43, 2001.

ZIMMERLI, L.; STEIN, M.; LIPKA, V.; SCHULZE-LEFER, P.; SOMERVILLE, S. Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, Oxford, v. 40, p. 633-646, 2004.

ZIPFEL, C.; FELIX, G. Plants and animals: a different taste for microbes? **Current Opinion in Plant Biology**, Cambridge, v. 8, p. 353-360, 2005.