Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

O papel do hormônio auxina na virulência do patógeno de cacau *Moniliophthora perniciosa*

Nathália Cassia Ferreira Dias

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2022

Nathália Cassia Ferreira Dias
Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

O papel do hormônio auxina na virulência do patógeno de cacau *Moniliophthora perniciosa*

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **PAULO JOSÉ PEREIRA LIMA TEIXEIRA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Dias, Nathália Cassia Ferreira

O papel do hormônio auxina na virulência do patógeno de cacau *Moniliophthora perniciosa* / Nathália Cassia Ferreira Dias - -versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.

85 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Auxina 2. Virulência 3. Cacau 4. Fitopatógeno I. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha querida mãe Aurea e ao meu irmão Evandro por todo apoio e incentivo durante esses anos, sem vocês eu não chegaria até aqui. Obrigada por tanto.

Agradeço toda minha família, à vô Adelina, aos tios Aroldo, Adriana, Alexandre, Jonas e as minhas primas Gabi, Alicia, Luly e Leninha

Agradeço aos meus amigos Cacks, Gabi e a Cris por mesmo longe me darem todo o suporte. Vocês são parte da minha familia.

Agradeço aos meus amigos e parceiros Mateus, Tamis, Gus e Aline por acreditarem em mim. Cada reunião com vocês é uma chuva de conhecimento e felicidade.

Agradeço aos meus amigos Bárbara, Letícia, Perla e o Luís, pelas incansáveis conversas e risadas.

Agradeço aos colegas e funcionários do CEBTEC por todo o apoio. Trabalhar em um ambiente agradável fez toda a diferença nessa caminhada.

Agradeço a todos os colegas do LaGIP pela compressão e ajuda durante esses anos. Vocês foram essenciais para a conclusão desse trabalho.

Agradeço ao Prof. Daniel pelas conversas, dicas e toda a disposição em ceder o espaço do seu laboratório para que esse trabalho fosse concluído.

Agradeço à Dr. Daniela Thomazella pelas dicas durante o trabalho e todo o apoio oferecido.

Agradeço ao meu orientador Paulo Teixeira pela confiança e conselhos durante essa fase da minha vida. Obrigada por me receber de braços abertos no seu time e me dar a oportunidade de aprender tanto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento : 00188887.483949/2020-00

A pesquisa no laboratório do Prof. Paulo Teixeira recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Instituto Serrapilheira.

“Tente mover o mundo - o

primeiro passo será mover a si mesmo.”

Platão

SUMÁRIO

RESUMO 8
ABSTRACT 9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 10
1. INTRODUÇÃO 13
1.1 O cacaueiro 13
1.2 A doença vassoura de bruxa e o fungo *Moniliophthora perniciosa* 15
1.3 Hormônios vegetais em interações planta-patógeno 20
1.4 Auxina como fator de virulência de patógenos 22
1.5 Evidências da participação da auxina no desenvolvimento da vassoura de bruxa 26
Referências 27
2 OBJETIVO 35
3 O FUNGO *Moniliophthora perniciosa* PRODUZ AUXINA E INTERFERE COM A RESPOSTA HORMONAL DO CACAUEIRO DURANTE A VASSOURA DE BRUXA . 36
Resumo 36
Abstract 36
3.1 Introdução 37
3.2 Materiais e Métodos 39
3.2.1 Inoculação de plântulas de cacaueiro com *M. perniciosa* 39
3.2.2 Extração do RNA e preparo de bibliotecas para RNA-seq 40
3.2.3 Processamento de *reads* de RNA-seq e identificação de genes diferencialmente expressos 40
3.2.4 Quantificação de compostos indólicos em culturas de *M. perniciosa* 41
3.2.5 Avaliação da resposta a auxina em *Arabidopsis thaliana* DR5::*GFP* 42
3.2.6 Detecção de IAA em culturas de *M. perniciosa* através de Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) 44
3.3 Resultados 45
3.3.1 Investigando a interação biotrófica entre o cacaueiro e o fungo *M. perniciosa* 45
3.3.2 Genes responsivos a auxina são induzidos em plantas infectadas 48
3.3.3 Genes do cacaueiro envolvidos na biossíntese de auxina não são induzidos pela doença 51
3.3.4 *M. perniciosa* possui genes potencialmente envolvidos na biossíntese de auxina 53
3.3.5 Produção de composto indólicos por *M. perniciosa.* 54

3.3.6 O sobrenadante de culturas de *M. perniciosa* ativa a resposta à auxina em *A. thaliana* 57
3.3.7 Detecção de IAA e seus intermediários por cromatografia líquida de alta eficiência 58
3.4 Discussão 60
3.5 Conclusão e Perspectivas.....63
Referências 64
Material Suplementar 68
4 MANIPULAÇÃO GENÉTICA DO FUNGO *Moniliophthora perniciosa* 70
Resumo.....70
Abstract.....70
4.1 Introdução 71
4.2 Materiais e Métodos.....73
4.2.1 Material biológico.....73
4.2.2 Preparação do constructo de DNA para a transformação de *M. perniciosa* 74
4.2.3 Transformação de protoplastos do fungo *M. perniciosa* 74
4.3 Resultados 76
4.3.1 Preparação de DNA para a transformação de *M. perniciosa* 76
4.3.2 Transformação do fungo *M. perniciosa* 77
4.4 Discussão 81
4.5 Conclusão e Perspectivas.....83
Referências 84

RESUMO

O papel do hormônio auxina na virulência do patógeno de cacau *Moniliophthora perniciosa*

O cacaueiro (*Theobroma cacao*) é uma cultura de grande importância socioeconômica em muitos países tropicais. Um dos principais fatores limitantes da produção de cacau na América Latina é a doença da vassoura de bruxa, causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*. Plantas afetadas pela doença apresentam alterações morfológicas intensas e desenvolvimento anormal dos tecidos infectados, o que indica a ocorrência de um desequilíbrio hormonal durante a infecção. No entanto, a contribuição de fitohormônios específicos para tais mudanças permanece pouco explorada. Através de análises transcriptômicas da progressão da doença, verificamos que o aumento da expressão de genes responsivos a auxina constitui uma das alterações moleculares mais notáveis em plantas infectadas. Contudo, genes do cacaueiro envolvidos na biossíntese de auxina não foram induzidos, sugerindo que esta resposta possa ser desencadeada diretamente pelo patógeno. De fato, a investigação do genoma de *M. perniciosa* revelou vias putativas para a produção de ácido indol-3-acético (IAA) a partir de L-triptofano (Trp), indicando o potencial deste fungo em produzir auxinas. Em concordância com essa predição, a suplementação de culturas de *M. perniciosa* com Trp induziu o acúmulo de compostos indólicos, incluindo IAA e o potencial intermediário indol-3-acetamida (IAM). Além disso, o sobrenadante livre de células de culturas do patógeno foi capaz de ativar a resposta à auxina em folhas e raízes de *Arabidopsis thaliana* DR5::*GFP*, confirmando a presença de IAA biologicamente ativa nestas culturas. Com o objetivo de obter mutantes incapazes de produzi IAA, trabalhamos no estabelecimento de um método de transformação de *M. perniciosa*, até então indisponível para esta espécie. O procedimento se mostrou altamente eficiente e abre portas para manipulação genética inédita do patógeno através de CRISPR/Cas9. Assim, nossos resultados estabelecem bases sólidas para a investigação do papel da IAA na virulência do fungo *M. perniciosa* e no desenvolvimento dos sintomas da vassoura de bruxa.

Palavras-chave: Auxina, Virulência, Cacau, Fitopatógeno

ABSTRACT

The role of auxin in the virulence of the cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa*

The cacao tree (*Theobroma cacao*) is a crop of great socioeconomic importance in many tropical countries. One of the main limiting factors for cocoa production in Latin America is witches' broom disease (WBD), caused by the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*. Tissues affected by WBD show intense morphological changes and abnormal development, which indicate the occurrence of hormonal imbalances during the infection. However, the contribution of specific plant hormones to such changes remains poorly explored. Through transcriptomic analyses of the disease progression, we found that the increased expression of auxin-responsive genes constitutes one of the most notable molecular alterations in infected plants. Nevertheless, cacao genes involved in the production of auxins were not induced, suggesting that this response may be directly triggered by the pathogen. In fact, the investigation of the *M. perniciosa* genome revealed putative pathways for indole-3-acetic acid (IAA) production from L-tryptophan (Trp), indicating the potential of this fungus to produce auxins. In agreement with this prediction, supplementation of *M. perniciosa* cultures with Trp induced the accumulation of indole compounds, including IAA and indole-3-acetamide (IAM). In addition, the cell-free supernatant of pathogen cultures was able to activate the auxin response in both leaves and roots of *Arabidopsis thaliana* DR5::*GFP*, confirming the presence of biologically active IAA in these cultures. With the goal of obtaining mutants incapable of producing IAA, we worked on the establishment of a method to transform *M. perniciosa*, which was previously unavailable for this species. The resulting procedure is highly efficient and opens new avenues for unprecedented genetic manipulation of this pathogen through CRISPR/Cas9. Thus, our results establish solid foundations for the investigation of the role of IAA in the *M. perniciosa* virulence and in the development of WBD symptoms.

Keywords: Auxin, Virulence, Cacao, Phytopathogen

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB1	*Auxin Signaling F-Box Proteins 1*
AJ	Ácido jasmônico
AS	Ácido salicílico
Aux/IAA	*Auxin/indole-3-acetic acid protein*
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CAMV	*Cauliflower mosaic vírus*
CPM	Contagem por milhão
CSEPs	*Candidate Secreted Effector Protein*
dai	Dias após a inoculação
ERF	*Ethylene Responsive Factor*
FDR	*False Discovery Rate*
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GFP	*Green Fluorescent Protein*
GH3	*Glycoside Hydrolase* 3
Glm	Modelos lineares generalizados
GAPDH	*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
HCl	Ácido clorídrico
Hph	*Hygromycin-B-phosphotransferase*
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IAM	Ácido indol-3-acetamida
IAN	Ácido indol-3-acetonitrila
IAOX	Indol-3-acetaldoxima
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPya	Ácido indol-3-pirúvico
KOH	Hidróxido de potássio
LaGIP	Laboratório de Genética e Imunologia de Plantas
LGE	Laboratório de Genômica e Expressão
MAMPs	*Microbe-associated Molecular Patterns*
MYEA	*Malt Yeast Extract Agar*

MpAOX	Oxidase alternativa de *M. perniciosa*
MpChi	Quitinase de *M. perniciosa*
MpATG8	*Autophagy-related protein 8*
MT	Micro -Tom
NEPs	*Necrosis and Ethylene-Inducing Proteins*
PCA	*Principal Component Analysis*
PEG	Polietilenoglicol
PTI	*PAMP-triggered immunity*
PR -1	*Pathogenesis -Related* protein 1
REMI	*Restriction Enzyme Mediated Integration*
SAUR	*Small auxin-up RNA*
TAL	*Transcription Activator-like*
TAM	Triptamina
TPM	*Transcripts per million*
Trp	L-triptofano
TSO	Cadeia lateral do triptofano
WBD	*Witches' broom disease*

1. INTRODUÇÃO

1.1 O cacaueiro

Originário da Bacia Amazônica, o cacaueiro (*Theobroma cacao*) é uma planta perene pertencente à família *Malvaceae* (BAUM et al., 2004). Domesticado há pelo menos 3600 anos na América do Sul e posteriormente na América Central (CORNEJO et al., 2018), esta planta é adaptada a climas quentes e úmidos, sendo atualmente cultivada em toda região tropical do globo (ARGOUT et al., 2011; PLOETZ, 2007; PURDY; SCHMIDT, 1996). Em condições naturais, o cacaueiro assemelha-se a uma grande touceira (Figura 1A), porém, em plantios comerciais as plantas são submetidas à poda e adquirem um aspecto de árvore (Figura 1B). As flores surgem em almofadas florais no tronco ou nos ramos (Figura 1C) e dão origem a frutos que possuem de 30 a 50 sementes (amêndoas) em seu interior (Figura 1D).

Figura 1. Características gerais do cacaueiro. (A) Cacaueiro selvagem apresentando aspecto de touceira. (B) Árvore de cacau cultivada apresentando frutos junto ao seu tronco. (C) Flor do cacaueiro, que se desenvolve em almofadas no tronco da árvore. (D) Um fruto de cacau maduro e suas sementes. (E) Amêndoas de cacau, principal produto de valor econômico do cacaueiro. Imagens retiradas do Portal Embrapa, unidade Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A exploração econômica do cacau baseia-se principalmente no uso de suas amêndoas (Figura 1E) pela indústria do chocolate, um produto apreciado em todo mundo e que movimenta um mercado de bilhões de dólares todos os anos (PLOETZ, 2007; PURDY; SCHMIDT, 1996). Além disso, a polpa de seus frutos é utilizada na produção de bebidas finas, sucos, geleias e cosméticos (PURDY; SCHMIDT, 1996). Atualmente, o continente Africano é o maior produtor de cacau, sendo responsável por aproximadamente 67.1% da produção mundial (Figura 2A) (FAOSTAT, 2021). Dentre os principais países produtores de amêndoas de cacau estão a Costa do Marfim, Gana,

Indonésia, Nigéria, Equador, Camarões, Brasil, Peru, Colômbia e República Dominicana (Figura 2B) (FAOSTAT, 2021).

O Brasil é país destaque na produção de cacau no continente americano (Figura 2B), ocupando atualmente a sétima posição no *ranking* de produção mundial (FAOSTAT, 2021). A maior parte da produção brasileira é oriunda do estado do Pará, que produziu cerca de 144,2 mil toneladas de amêndoas de cacau em 2020 (GUERRA; FERREIRA, 2021). Já o estado da Bahia, que durante anos liderou a produção no Brasil, atualmente produz em torno de 110 mil toneladas de amêndoas, ocupando o posto de segundo maior produtor nacional (GUERRA; FERREIRA, 2021). Juntos, estes estados devem corresponder por 94,2% de toda produção brasileira no ano de 2021 (GUERRA; FERREIRA, 2021).

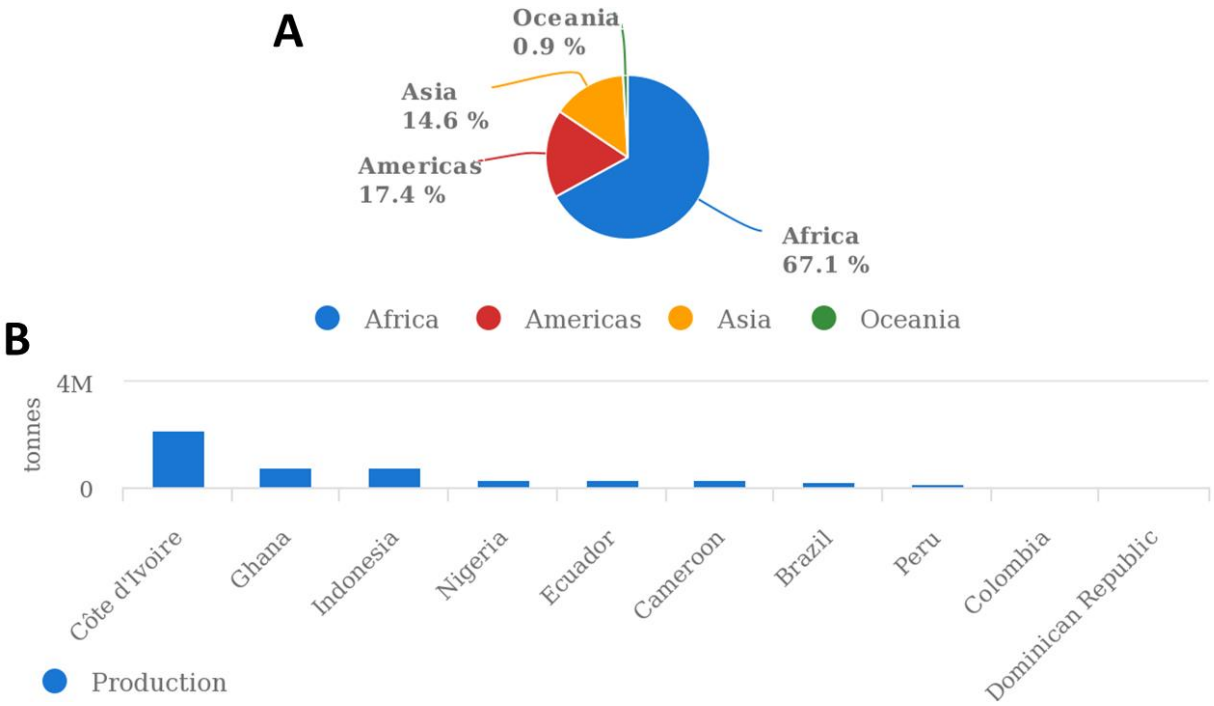

Figura 2. Produção mundial de amêndoas de cacau no ano de 2019. (A) Proporção de amêndoas de cacau produzidas em cada continente. O continente Africano aparece como maior produtor (azul), respondendo por 67,1% da produção mundial. (B) Principais países produtores de amêndoas de cacau no mundo no ano de 2019. Produção em toneladas dos 10 maiores produtores apresentados em ordem decrescente. Figura preparada com dados da FAOSTAT (2021).

Com o início do cultivo do cacaueiro em 1752 no município de Ilhéus, a região sul da Bahia tornou-se rapidamente a principal área de produção nacional (RIBEIRO, 2020). No fim da década de 1980, o Brasil era o segundo maior exportador mundial de

amêndoas, chegando a produzir mais de 400 mil toneladas por ano (Figura 3). No entanto, a introdução da doença vassoura de bruxa na região em 1989 impactou severamente o país, que teve sua produção reduzida para 150 mil toneladas anuais e, em poucos anos, se tornou importador do produto (Figura 3) (MEINHARDT et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2015). Passados trinta anos, apesar de estratégias de manejo serem atualmente empregadas para mitigar os prejuízos, o país ainda não foi capaz de retomar os níveis de produção de antes da introdução da doença (MEINHARDT et al., 2008; TEIXEIRA; THOMAZELLA; PEREIRA, 2015).

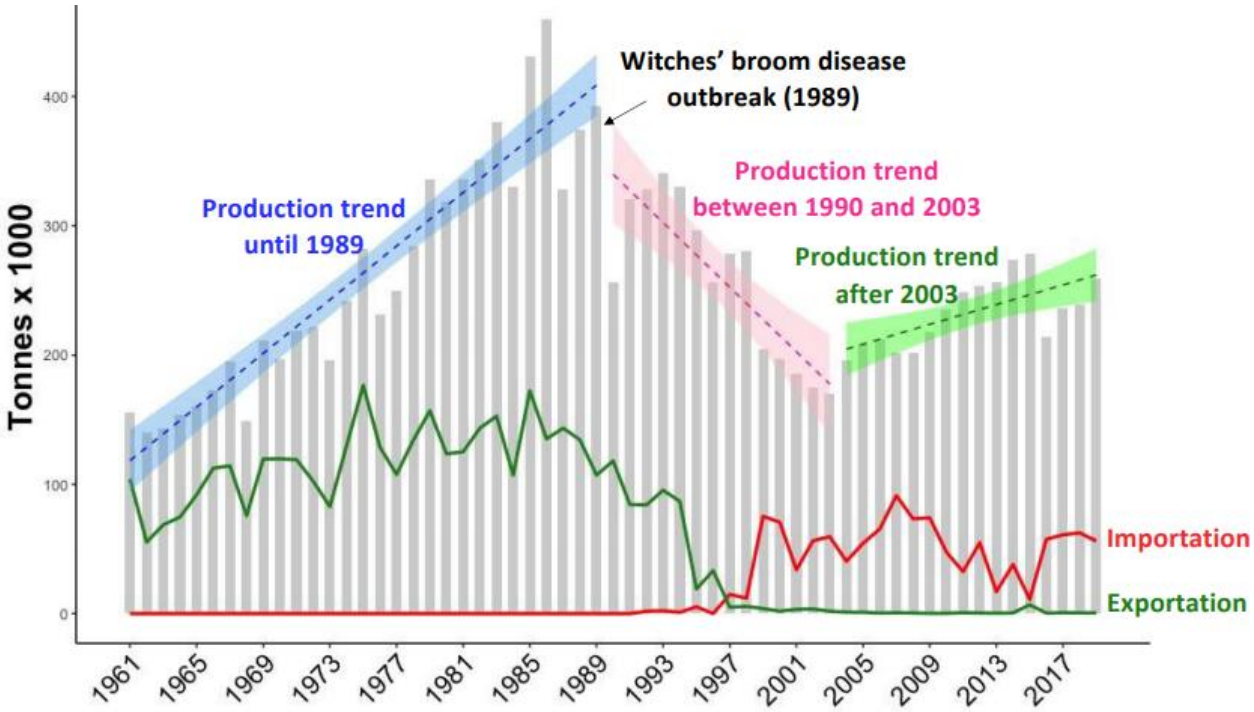

Figura 3. Produção e comércio de amêndoas de cacau no Brasil (1961-2017). A produção de cacau no Brasil apresentou tendência crescente (regressão linear em azul) até o fim da década de 1980. No entanto, com a introdução do fungo *M. perniciosa* na Bahia em 1989 (seta preta), a produção nacional entrou em declínio (regressão linear em rosa). A adoção de práticas de manejo e, principalmente, transferência da produção de cacau para outras regiões do Brasil, levou a uma retomada na produção brasileira a partir de meados dos anos 2000 (regressão linear em verde). Porém, o país mantém a condição de importador de cacau desde o final dos anos 1990 (linha vermelha), deixando o seu posto de exportador há mais de 20 anos (linha verde). Figura preparada com dados da FAOSTAT (2021).

1.2 A doença vassoura de bruxa e o fungo *Moniliophthora perniciosa*

Causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005), a vassoura de bruxa é um importante problema sanitário nas Américas e está entre as principais razões pelo declínio da produção de amêndoas de cacau no

continente (PLOETZ, 2007; PURDY; SCHMIDT, 1996). Essa doença não afeta apenas o suprimento de cacau, mas também tem um grande impacto ambiental. Necessitando de sombra para o seu desenvolvimento, o cacaueiro é cultivado principalmente no sistema Cabruca (Figura 4), caracterizado pelo uso de florestas nativas para o sombreamento da cultura. Esse tipo de sistema é considerado sustentável, tendo um papel importante na preservação de florestas nas áreas de produção (LOBÃO et al., 2007). Com as perdas na produção associadas à doença, muitos produtores de cacau da Bahia passaram a utilizar seus terrenos para o plantio de outras culturas ou para a criação de animais, levando à destruição de parte da área de Mata Atlântica da região (MEINHARDT et al., 2008).

Figura 4. Cultivo do cacaueiro em Cabruca. Neste sistema de cultivo, o cacaueiro é plantado em meio à floresta, que fornece a sombra necessária para o seu desenvolvimento. Este sistema é ecologicamente sustentável e favorece a preservação de plantas nativas. Imagem retirada do Portal Embrapa, unidade Embrapa Amazônia Oriental.

Assim como o cacaueiro, o fungo *M. perniciosa* é originário da região Amazônica, apresenta uma biologia complexa e grande variabilidade genética (MEINHARDT et al., 2008; PURDY; SCHMIDT, 1996). Sendo considerada uma das principais doenças do

cacaueiro, a vassoura de bruxa disseminou-se pela América Latina e constitui um importante fator limitante para produção de amêndoas de cacau neste continente (ANDEBRHAN et al., 1999; PURDY; SCHMIDT, 1996). Diante da severidade da doença, métodos de controle como a poda fitossanitária, o uso de controle biológico, o uso de fungicidas químicos e o desenvolvimento de variedades de cacau resistentes vêm sendo empregados, porém, sem grande efetividade (PURDY; SCHMIDT, 1996).

O fungo *M. perniciosa* possui um ciclo de vida hemibiotrófico, ou seja, apresenta duas fases distintas de vida (biotrófica e necrotrófica), que se desenvolvem em paralelo aos sintomas da doença (PURDY; SCHMIDT, 1996). Este fungo é capaz de infectar diversos hospedeiros, sendo atualmente subdividido em três biótipos (GRIFFITH; HEDGER, 1994). Os isolados do biótipo-C causam doença no cacaueiro e em outras espécies relacionadas. O biótipo-L foi isolado de tecidos mortos de lianas e aparentemente coloniza tecidos vivos do hospedeiro sem induzir sintomas. Os isolados do biótipo-S infectam espécies da família *Solanaceae,* como tomateiro e pimentão (ANDEBRHAN et al., 1999; GRIFFITH; HEDGER, 1994; PIERRE et al., 2017; TEIXEIRA; THOMAZELLA; PEREIRA, 2015). Os biótipos C e S parecem ser próximos geneticamente, causando sintomas semelhantes nas plantas hospedeiras, o que indica que podem empregar estratégias de patogenicidade conservadas (TEIXEIRA; THOMAZELLA; PEREIRA, 2015).

A infecção pelo fungo *M. perniciosa* inicia-se com a produção de basidiósporos oriundos de pequenos cogumelos (basidiomas) formados nos tecidos das plantas infectadas (MEINHARDT et al., 2008; MONDEGO et al., 2008). Dispersados principalmente pelo vento e pela água durante o período noturno, os basidiósporos, em condições de alta umidade, são capazes de infectar novos tecidos meristemáticos do cacaueiro, incluindo ramos, flores e frutos (MEINHARDT et al., 2008; MONDEGO et al., 2008). *M. perniciosa* penetra na epiderme de maneira direta, ou através dos estômatos e ferimentos e não produz haustórios durante a infecção (SENA; ALEMANNO; GRAMACHO, 2014). Após a penetração na planta, o micélio se aloja no apoplasto vegetal e, apesar de estar presente em baixa densidade, causa drásticas alterações morfológicas no cacaueiro (EVANS, 1980; MEINHARDT et al., 2008; MONDEGO et al., 2008). Em ramos, essas alterações incluem clorose, hiperplasia, hipertrofia e perda da

dominância apical, sugerindo a ocorrência de um desequilíbrio hormonal nessa fase, denominada de “vassoura verde” (Figura 5A, Figura 5B) (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005; PURDY; SCHMIDT, 1996; TEIXEIRA et al., 2014).

Estruturas como frutos jovens e flores também podem ser infectadas por *M. perniciosa* (EVANS, 1980). Em frutos infectados, é comum o aparecimento de deformações e necrose (Figura 5C), enquanto que a infecção de flores frequentemente leva ao desenvolvimento de pequenos frutos partenocárpicos (Figura 5D) (MEINHARDT et al., 2008). Nesse estágio da doença, os tecidos infectados apresentam também alterações bioquímicas, como o aumento da degradação oxidativa de lipídios e a produção de espécies reativas de oxigênio, o que sugere a ocorrência de estresse oxidativo (SCARPARI et al., 2005).

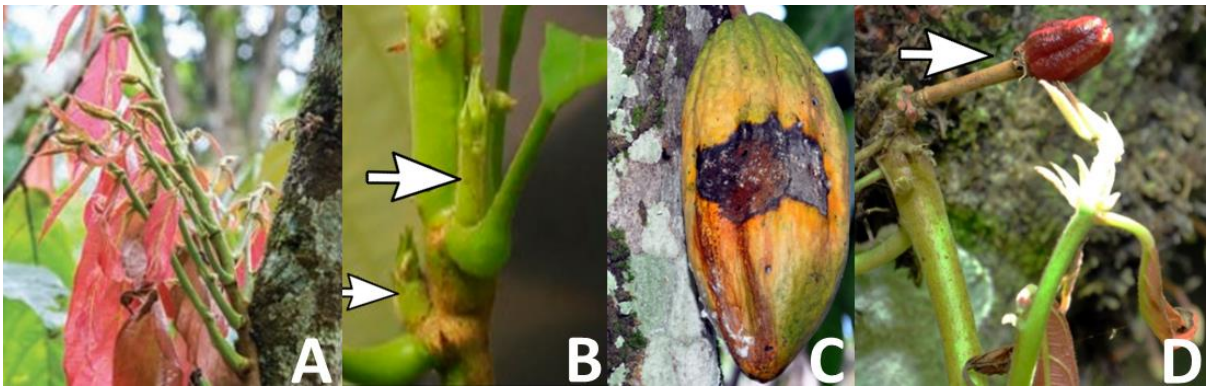

Figura 5. Estágio biotrófico da doença vassoura de bruxa em diferentes tecidos do cacaueiro. (A) Brotamento foliar com proliferação na gema lateral e engrossamento dos tecidos infectados. Nota-se a clorose das folhas e hipertrofia do caule. (B) Detalhe da perda de dominância apical (setas) observada em uma plântula infectada. (C) Fruto infectado em processo de necrose. Nota-se também o amadurecimento não uniforme (D) Flor infectada. Nota-se o surgimento de fruto partenocárpico, denominado “morangos” (seta). Imagens retiradas de Teixeira e colaboradores (2014), CEPLAC (2018) e SENAR (2018).

Após um longo período de interação biotrófica (um a três meses), o ramo infectado (vassoura verde) morre e passa a ser denominado vassoura seca (Figura 6), que caracteriza a fase necrotrófica da doença (MEINHARDT et al., 2008; MONDEGO et al., 2008; SENA; ALEMANNO; GRAMACHO, 2014; TEIXEIRA et al., 2014). Ainda pouco compreendida, a transição para a fase necrotrófica é caracterizada pela formação de micélios dicarióticos que possuem grampos de conexão entre células adjacentes na hifa (Figura 6) (EVANS, 1980; MEINHARDT et al., 2008; TEIXEIRA;

THOMAZELLA; PEREIRA, 2015). Após períodos intermitentes de chuva, ocorre a produção de basidiomas no tecido morto e, posteriormente, a produção e liberação de basidiósporos no ambiente (Figura 6) (PURDY; SCHMIDT, 1996; SENA; ALEMANNO; GRAMACHO, 2014; TEIXEIRA; THOMAZELLA; PEREIRA, 2015). Assim, os basidiósporos poderão infectar novas plantas, reiniciando o ciclo de vida do patógeno (TEIXEIRA; THOMAZELLA; PEREIRA, 2015).

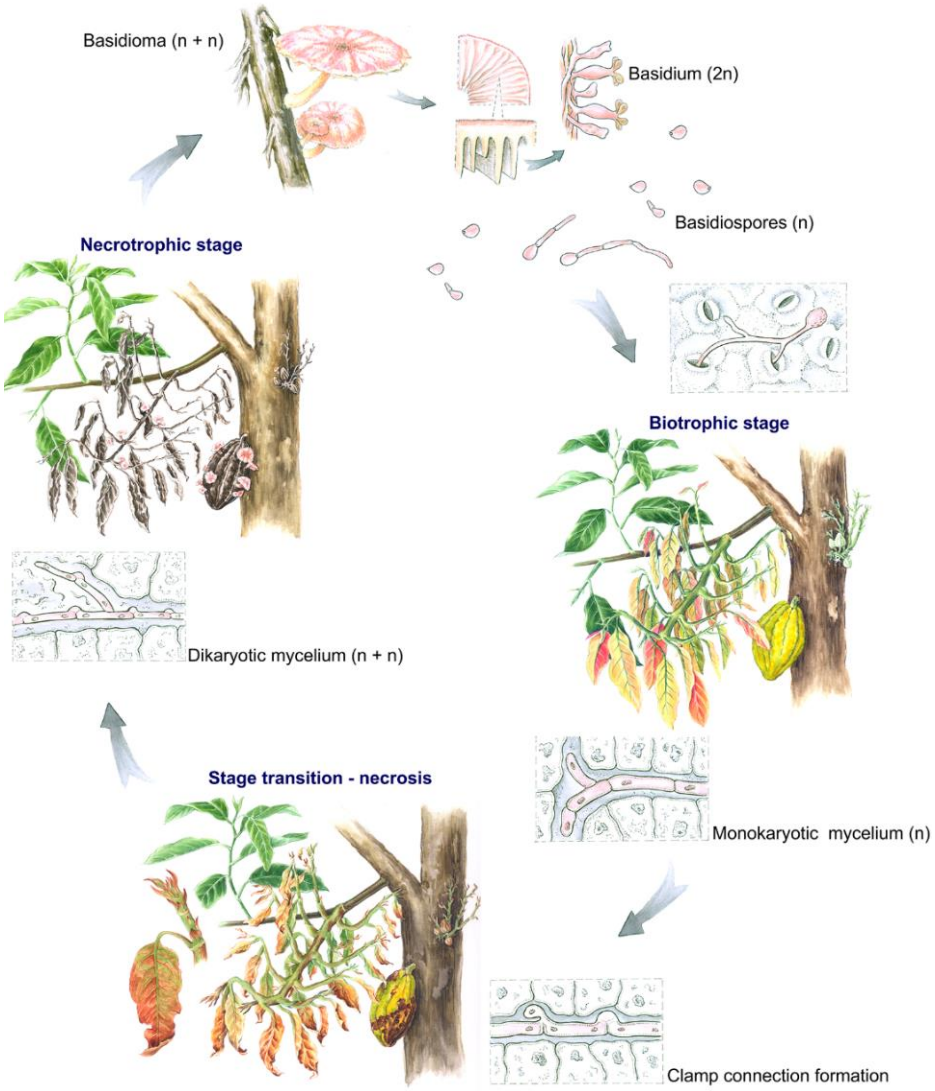

Figura 6. Ciclo de vida do fungo *Moniliophthora perniciosa* durante a infecção do cacaueiro.
A infecção se inicia com a germinação dos basidiósporos do patógeno sobre tecidos meristemáticos em atividade do hospedeiro. O micélio resultante é monocariótico e coloniza exclusivamente o apoplasto da planta, levando ao desenvolvimento de drásticas alterações morfológicas nos tecidos infectados. A infecção de ramos resulta em uma estrutura anormal conhecida como “vassoura verde”. Após um a três meses de interação biotrófica, o tecido vegetal infectado morre e o fungo entra em sua fase necrotrófica, a qual é caracterizada por intenso crescimento e presença de micélio dicariótico. O ramo infectado morto

passa a ser denominado “vassoura seca”. Ao final, basidiomas são formados a partir de hifas necrotróficas, completando o ciclo de vida do patógeno (TEIXEIRA; THOMAZELLA; PEREIRA, 2015).

1.3 Hormônios vegetais em interações planta-patógeno

Fitohormônios desempenham funções centrais no desenvolvimento, crescimento, reprodução e respostas a estresses durante o ciclo de vida de qualquer planta (PIERRE et al., 2017; ROBERT-SEILANIANTZ et al., 2007). Em particular, o etileno, ácido salicílico (AS) e ácido jasmônico (AJ) são considerados os principais hormônios reguladores de respostas de defesa contra patógenos (PATKAR; NAQVI, 2017). Em geral, uma resposta efetiva contra patógenos biotróficos e hemibiotróficos é mediada por ácido salicílico. Por outro lado, a resistência contra patógenos necrotróficos costuma ser mediada pelos hormônios etileno e ácido jasmônico (ROBERT-SEILANIANTZ et al., 2007; ROBERT-SEILANIANTZ; GRANT; JONES, 2011). Essas duas vias de sinalização (ácido salicílico e ácido jasmônico/etileno) costumam ser mutualmente antagonistas, de forma que a ativação de uma leva à supressão da outra (SPOEL; DONG, 2008). Ou seja, a ativação de uma resposta imune mediada por ácido salicílico pode levar à resistência contra patógenos biotróficos, mas susceptibilidade a patógenos necrotróficos (SPOEL; DONG, 2008). De maneira oposta, a ativação de uma resposta mediada por ácido jasmônico/etileno pode levar à resistência contra patógenos necrotróficos, mas susceptibilidade contra biotróficos (SPOEL; DONG, 2008). Dessa forma, não é surpreendente que microrganismos tenham evoluído estratégias para manipular a sinalização hormonal de seus hospedeiros (KAZAN; LYONS, 2014). Por exemplo, diversos patógenos filamentosos (e.g., *Ustilago maydis*, *Verticillium dahliae* e *Phytophthora sojae*) utilizam proteínas efetoras para suprimir a biossíntese de ácido salicílico por seus hospedeiros (DJAMEI et al., 2011; LIU et al., 2014; ZHU et al., 2017). De forma análoga, efetores que promovem a ativação da resposta ao ácido jasmônico também já foram reportados em diferentes patógenos ou mesmo em microrrizas (GIMENEZ-IBANEZ et al., 2014; JIANG et al., 2013; PLETT et al., 2014; SUGIO et al., 2011; YANG et al., 2017). Notavelmente, algumas estirpes da bactéria *Pseudomonas syringae* produzem um mímico estrutural do ácido jasmônico complexado à isoleucina (a forma biologicamente ativa deste hormônio). Denominada coronatina, esta molécula leva à supressão da via de defesa mediada por ácido

salicílico e, portanto, promove suscetibilidade ao patógeno (HANN et al., 2014; HE et al., 2004).

Além do AS, AJ e etileno, hormônios como citocinina, giberelina e auxina vêm sendo apontados como moduladores (positivos ou negativos) do sistema imune vegetal (MA; MA, 2016). Entretanto, os efeitos são normalmente contexto-dependentes e as bases moleculares nem sempre são compreendidas (MA; MA, 2016). Por exemplo, a aplicação exógena de citocininas pode promover resistência ou suscetibilidade em diferentes espécies de plantas a depender da dose do hormônio utilizada (ALBRECHT; ARGUESO, 2017). Trabalhos pioneiros demonstraram que o tratamento de *Arabidopsis thaliana* com altas concentrações (10 – 100 µM) de citocininas reduz a suscetibilidade da planta ao oomiceto *Hyaloperonospora arabidopsidis* e à bactéria *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (ARGUESO et al., 2012a; CHOI et al., 2010). O crescimento reduzido destes patógenos em plantas tratadas com citocininas é acompanhado de um aumento da expressão de genes de defesa e da deposição de calose nos tecidos infectados (CHOI et al., 2010). Ainda, este efeito (i.e., ativação do sistema imune vegetal) requer receptores de citocinina da família AHK (*Arabidopsis Histidine Kinase*) bem como componentes da via de sinalização por ácido salicílico, consistente com uma ação sinérgica destes hormônios em resposta a patógenos (hemi)biotróficos. Curiosamente, citocininas não induzem a ativação de defesas na ausência de patógenos ou elicitores, demonstrando um efeito específico desta classe de hormônios no contexto de uma infecção (ALBRECHT; ARGUESO, 2017). Em alguns casos, porém, citocininas podem promover suscetibilidade. Em geral, a administração de baixas concentrações (<1 µM) de uma citocinina exógena favorece o desenvolvimento de invasores (ARGUESO et al., 2012b; CHOI et al., 2010). Os mecanismos responsáveis por este aumento de suscetibilidade ainda não são compreendidos, mas possivelmente envolvem o aumento da disponibilidade de nutrientes (açúcares e aminoácidos) no sítio da infecção ou mesmo a supressão de vias de defesa específicas (JAMESON, 2000).

Giberelinas também desempenham papéis ambíguos na rede de sinalização do sistema imune vegetal (DE BRUYNE; HÖFTE; DE VLEESSCHAUWER, 2014). Em alguns casos, contribuem para o desenvolvimento de sintomas de doenças, enquanto

que em outros casos são necessários para respostas de defesa e indução de resistência das plantas (DE BRUYNE; HÖFTE; DE VLEESSCHAUWER, 2014). Em arroz, a administração de giberelina exógena promove suscetibilidade à bactéria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (QIN et al., 2013). Consistente com um papel negativo deste hormônio na imunidade contra este patógeno, mutantes comprometidos na inativação de giberelina são mais suscetíveis a *X. oryzae* pv. *oryzae* (YANG et al., 2008). Por outro lado, sintomas da doença podridão radicular do arroz, causada pelo oomiceto *Pythium graminicola*, são mais severos em mutantes deficientes ou insensíveis a giberelina, sugerindo um papel positivo do hormônio na imunidade contra este patógeno (DE VLEESSCHAUWER et al., 2012).

A auxina também pode atuar como modulador da imunidade vegetal (FU; WANG, 2011). Conhecido como regulador negativo de respostas mediadas por ácido salicílico (CHOI et al., 2010; MUTKA et al., 2013; WANG et al., 2007) e um regulador positivo de respostas mediadas por ácido jasmônico (NAGPAL et al., 2005; REEVES et al., 2012), esse hormônio costuma promover suscetibilidade a patógenos (hemi)biotróficos e resistência a necrotróficos (ROBERT-SEILANIANTZ et al., 2007; ROBERT-SEILANIANTZ; GRANT; JONES, 2011). De fato, uma linhagem de *Arabidopsis* hipersensível à auxina devido à superexpressão do receptor AFB1 (*Auxin Signaling F-Box Proteins 1*) apresenta níveis reduzidos de ácido salicílico e suscetibilidade aumentada à bactéria hemibiotrófica *P. syringae* (FU; WANG, 2011; NAVARRO et al., 2006). Ainda, mutantes que apresentam a sinalização de auxina comprometida são mais suscetíveis aos fungos necrotróficos *Plectosphaerella cucumerina* e *Botrytis cinerea* (LLORENTE et al., 2008). Curiosamente, o estabelecimento de uma resposta de defesa efetiva induzida pelo reconhecimento de MAMPs (*Microbe-associated Molecular Patterns*) envolve a supressão do metabolismo de auxina, demonstrando o antagonismo entre este hormônio e componentes do sistema imune vegetal (NAVARRO et al., 2006; WONG et al., 2014).

1.4 Auxina como fator de virulência de patógenos

Auxinas são reconhecidos reguladores de processos relacionados ao desenvolvimento vegetal. Estes hormônios são bem conhecidos por estimularem a

divisão e elongação celular, promovendo o crescimento dos tecidos da planta. Outros papéis relacionados ao desenvolvimento vegetal incluem a promoção do desenvolvimento vascular e a manutenção e diferenciação de meristemas (FU; WANG, 2011; KAZAN; LYONS, 2014; MOUBAYIDIN; DI MAMBRO; SABATINI, 2009). Como descrito acima, auxinas também podem contribuir para a regulação de respostas de defesa em plantas. Apesar do papel como fitohormônio ser o mais amplamente conhecido, auxinas também desempenham diferentes funções em microrganismos (descrito abaixo). O aminoácido triptofano (Trp) é o precursor para a biossíntese de auxina na maioria dos organismos estudados (DI et al., 2016). Até o momento, quatro principais vias para a biossíntese de auxina (ácido indol-3-acético; IAA) já foram descritas (Figura 7): (i) via da indol-3-acetamida (IAM); (ii) via da triptamina (TAM); (iii) via do indol-3-acetonitrila (IAN) ou via do indol-3-acetaldoxima (IAOx), e (iv) a via do ácido indol-3-pirúvico (IPya), considerada a mais importante em plantas (DI et al., 2016). Existe ainda a via da oxidase de cadeia lateral do triptofano (TSO) (Figura 7), exclusiva de microrganismos (OBERHÄNSLI; DÉFAGO; HAAS, 1991). A via do IAM é mais bem caracterizada em bactérias fitopatogênicas, enquanto que em fungos a produção de auxina ocorre principalmente através das vias do IPya e da TAM (DI et al., 2016). A existência de vias que independem de triptofano tem sido especulada tanto em plantas quanto em microrganismos, mas estas parecem possuir um papel secundário e permanecem desconhecidas até o momento (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

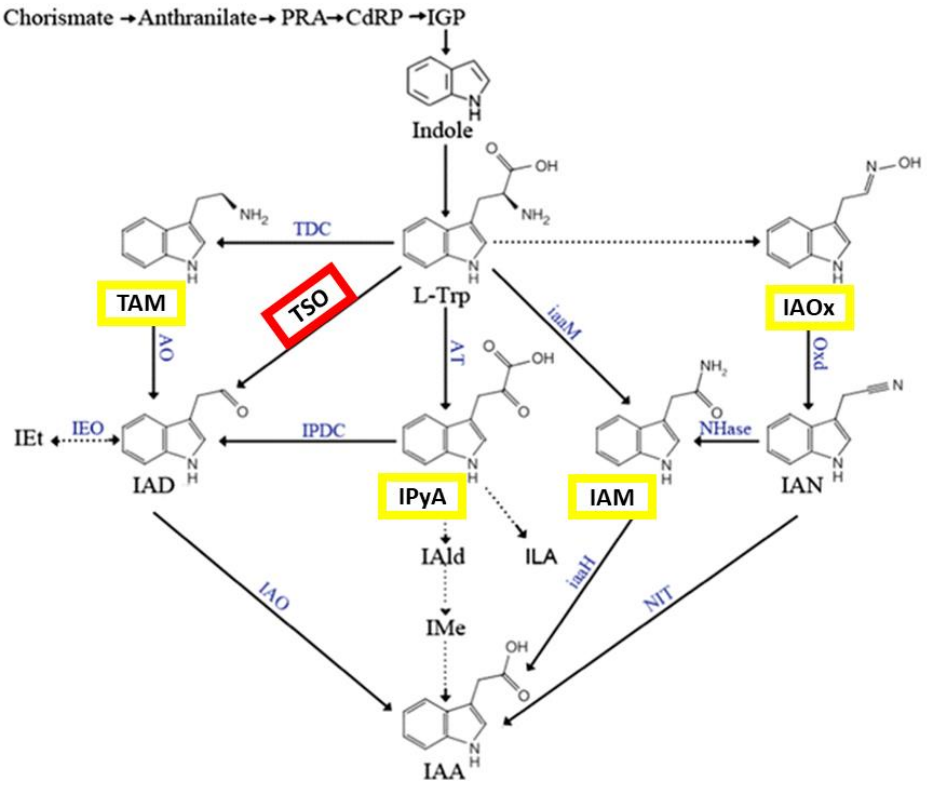

Figura 7. Principais vias de biossíntese de auxina a partir do aminoácido triptofano. Quatro principais vias (caixa amarela) para a produção de IAA já foram descritas. A via TSO foi descrita apenas para microrganismos (caixa vermelha). As enzimas para as quais as funções são conhecidas, estão destacadas em azul; linhas solidas e tracejadas indicam processos para os quais os genes foram e não foram identificados, respectivamente. Imagem adaptada de Di e colaboradores (2016).

Em microrganismos, uma diversidade de funções já foi sugerida para auxinas. Em espécies selvagens de leveduras do gênero *Saccharomyces*, a capacidade de biosintetizar IAA parece estar relacionada com a inibição do crescimento de competidores que ocupam o mesmo nicho (LIU; CHEN; CHOU, 2016). Bactérias fixadoras de nitrogênio podem produzir IAA durante o processo de formação de nódulo em leguminosas, além de influenciarem indiretamente na homeostase e transporte deste hormônio no hospedeiro (MATHESIUS, 2008; SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011). Já em microrganismos patogênicos, a produção de auxina é frequentemente apontada como uma estratégia de virulência. Por exemplo, bactérias que induzem a formação de galhas (e.g*., Agrobacterium*) induzem a produção de auxinas e citocininas para promover a infecção (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011). Propõe-se que o crescimento exagerado do tecido vegetal induzido por estes hormônios contribua para o aumento da disponibilidade de nutrientes no sítio de infecção, o que favorece a bactéria

(SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011). Os patógenos do arroz *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* e *Magnaporthe oryzae* são capazes de produzir e secretar IAA (FU et al., 2011). Sugere-se que o IAA exógeno (i.e., produzido pelo patógeno) seja capaz de estimular a síntese de IAA pela própria planta no local da infecção, levando ao afrouxamento da parede celular que favorece a infecção pelos patógenos (FU et al., 2011). A produção de IAA também já foi demonstrada para diversos fungos fitopatogênicos evolutivamente não relacionados e capazes de infectar múltiplas espécies de plantas (MAOR et al., 2004; TANAKA et al., 2011; TSAVKELOVA et al., 2012; YIN et al., 2014). Curiosamente, mutantes de *Ustilago maydis* incapazes de converter indol-3-acetaldeído e triptamina (ambos intermediário da via de biossíntese de auxina em plantas) em IAA não apresentam redução na virulência e mantém a capacidade de induzir tumores característicos da doença carvão do milho (REINEKE et al., 2008). Ainda assim, os níveis de auxina nos tecidos infectados é drasticamente reduzido, indicando que a formação dos tumores independe da auxina produzida pelo patógeno nesta interação.

Além de sintetizarem auxina, fitopatógenos também podem manipular as vias de síntese e sinalização de seus hospedeiros diretamente utilizando proteínas efetoras. Por exemplo, a bactéria *P. syringae* utiliza o efetor AvrRpt2 para degradar repressores (i.e., proteínas AUX/IAA) que regulam fatores de transcrição responsivos a auxina em Arabidopsis (CHEN et al., 2007). Como consequência, a resposta a este hormônio é aumentada no tecido infectado, o que promove suscetibilidade ao patógeno (CHEN et al., 2007). Ainda, a bactéria *X. citri subsp. citri* utiliza efetores TAL (*Transcription Activator-like*) para ativar diretamente a transcrição de genes envolvidos na síntese, transporte e sinalização de auxina de seu hospedeiro. Notavelmente, isto é necessário para o desenvolvimento das intensas alterações morfológicas que caracterizam o cancro cítrico, doença causada por este patógeno (KAY; BONAS, 2009; PEREIRA et al., 2014). Assim, a importância da auxina em interações planta-patógeno é destacada pela observação de que os patógenos desenvolveram múltiplas estratégias para manipular a ação desse hormônio em seus hospedeiros (ALBRECHT; ARGUESO, 2017). A forma pela qual a auxina favorece o patógeno parece ser bastante variável entre os sistemas já estudados, mas deve incluir o afrouxamento da parede celular

vegetal, aumento da disponibilidade nutricional e supressão da imunidade desencadeada por ácido salicílico (CHEN et al., 2007; COSGROVE, 1993; FU; WANG, 2011; GOTTIG et al., 2009; MUTKA et al., 2013).

1.5 Evidências da participação da auxina no desenvolvimento da vassoura de bruxa

As notáveis alterações morfológicas observadas em tecidos infectados pelo fungo *M. perniciosa* sugerem que o patógeno induza um desequilíbrio hormonal no hospedeiro. Em particular, a auxina vem sendo apontada como um fator envolvido no desenvolvimento da vassoura de bruxa há décadas (EVANS, 1980). Ramos infectados apresentam crescimento exagerado, com notável hiperplasia e hipertrofia das células (MEINHARDT et al., 2008). Similarmente, a deformação observada em frutos infectados por *M. perniciosa* poderia ser explicada pelo crescimento não homogêneo causado pela atividade de auxina em regiões infectadas (MEINHARDT et al., 2008). Ainda, almofadas florais afetadas pela doença frequentemente resultam em frutos partenocárpicos popularmente denominados “moranguinhos”. Notavelmente, a ação da auxina em flores pode induzir partenocarpia em diferentes espécies de plantas (PANDOLFINI; MOLESINI; SPENA, 2007). De fato, a aplicação deste hormônio é uma estratégia empregada comercialmente para a obtenção de frutos sem sementes em diversas culturas. Assim, é possível que o desenvolvimento dos moranguinhos durante a vassoura de bruxa seja consequência da presença de níveis aumentados de auxina nas flores infectadas.

A análise transcriptômica de plantas no estágio biotrófico da doença (i.e., vassoura verde) revelou a forte indução de genes responsivos à auxina (famílias *GH3*, *SAUR* e *Aux/IAA*) nos tecidos infectados do cacaueiro (TEIXEIRA et al., 2014). Estas mesmas famílias de genes também são induzidas em frutos partenocárpicos (MELNICK et al., 2012). Similarmente, uma linhagem de tomateiro que carrega o constructo repórter DR5::*GUS* (ativado por auxina) também indicou o aumento da resposta a esse hormônio quando infectado pelo biótipo-S de *M. perniciosa* (MARELLI et al., 2009). De fato, um trabalho recente mostrou um aumento nos níveis de ácido indol-3-acético no modelo Micro-Tom (MT) do tomateiro infectado por *M. perniciosa* (COSTA et al., 2021).

Apesar das evidências que sugerem o aumento da resposta a auxina em plantas afetadas pela vassoura de bruxa, o papel deste hormônio no desenvolvimento da doença ainda não está claro. De maneira similar, a causa desta resposta aumentada ou a origem deste hormônio também não foram exploradas.

Referências

AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v. 97, n. 5, p. 1012–1022, out. 2005.

ALBRECHT, T.; ARGUESO, C. T. Should I fight or should I grow now? The role of cytokinins in plant growth and immunity and in the growth-defence trade-off. **Annals of Botany**, v. 119, n. 5, p. 725–735, 1 mar. 2017.

ANDEBRHAN, T. et al. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis perniciosa*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p. 167–175, 1999.

ARGOUT, X. et al. The genome of *Theobroma cacao*. **Nature Genetics**, v. 43, n. 2, p. 101–108, fev. 2011.

ARGUESO, C. T. et al. Two-Component Elements Mediate Interactions between Cytokinin and Salicylic Acid in Plant Immunity. **PLOS Genetics**, v. 8, n. 1, p. e1002448, 26 jan. 2012b.

BAUM, D. A. et al. Phylogenetic relationships of Malvatheca (Bombacoideae and Malvoideae; Malvaceae sensu lato) as inferred from plastid DNA sequences. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 11, p. 1863–1871, nov. 2004.

CEPLAC. **Publicação quadrimestral do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC)/ CEPLAC**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/ceplac/publicacoes/revista-agrotropica/revista-volumes/2000-a-2010/revista-agrotropica-vol-30-no-1-2018.pdf>. Acesso em: 5 nov. 2021.

CHEN, Z. et al. *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 50, p. 20131–20136, 11 dez. 2007.

CHOI, J. et al. The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*. **Developmental Cell**, v. 19, n. 2, p. 284–295, 17 ago. 2010.

CORNEJO, O. E. et al. Population genomic analyses of the chocolate tree, *Theobroma cacao* L., provide insights into its domestication process. **Communications Biology**, v. 1, n. 1, p. 1–12, 16 out. 2018.

COSGROVE, D. J. Wall extensibility: its nature, measurement and relationship to plant cell growth. **New Phytologist**, v. 124, n. 1, p. 1–23, 1993.

COSTA, J. L. et al. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao, interferes with cytokinin metabolism during infection of Micro-Tom tomato and promotes symptom development. **The New Phytologist**, v. 231, n. 1, p. 365–381, jul. 2021.

DE BRUYNE, L.; HÖFTE, M.; DE VLEESSCHAUWER, D. Connecting growth and defense: the emerging roles of brassinosteroids and gibberellins in plant innate immunity. **Molecular Plant**, v. 7, n. 6, p. 943–959, 1 jun. 2014.

DE VLEESSCHAUWER, D. et al. Brassinosteroids antagonize gibberellin- and salicylate-mediated root immunity in rice. **Plant Physiology**, v. 158, n. 4, p. 1833–1846, 1 abr. 2012.

DI, D.-W. et al. The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA? **Plant Growth Regulation**, v. 78, n. 3, p. 275–285, 1 abr. 2016.

DJAMEI, A. et al. Metabolic priming by a secreted fungal effector. **Nature**, v. 478, n. 7369, p. 395–398, out. 2011.

EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, n. 3, p. 515–523, 1 jun. 1980.

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT Statistical Database**. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Acesso em: 3 nov. 2021.

FU, J. et al. Manipulating broad-spectrum disease resistance by suppressing pathogen-induced auxin accumulation in rice. **Plant Physiology**, v. 155, n. 1, p. 589–602, jan. 2011.

FU, J.; WANG, S. Insights into Auxin Signaling in Plant–Pathogen Interactions. **Frontiers in plant science**, v. 2, p. 74, 1 nov. 2011.

GIMENEZ-IBANEZ, S. et al. The bacterial effector HopX1 targets JAZ transcriptional repressors to activate jasmonate signaling and promote infection in *Arabidopsis*. **PLOS Biology**, v. 12, n. 2, p. e1001792, 18 fev. 2014.

GOTTIG, N. et al. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. **PLOS ONE**, v. 4, n. 2, p. e4358, 4 fev. 2009.

GRIFFITH, G. W.; HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis perniciosa*. **Heredity**, v. 72, n. 3, p. 278–289, mar. 1994.

GUERRA, S. C.; FERREIRA, M. M. Levantamento sistemático da produção agrícola. Estatística da produção agrícola. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatistica - IBGE**, p. 94, 2021.

HANN, D. R. et al. The *Pseudomonas* type III effector HopQ1 activates cytokinin signaling and interferes with plant innate immunity. **The New Phytologist**, v. 201, n. 2, p. 585–598, jan. 2014.

HE, P. et al. Activation of a COI1-dependent pathway in *Arabidopsis* by *Pseudomonas syringae* type III effectors and coronatine. **The Plant Journal**, v. 37, n. 4, p. 589–602, 2004.

JAMESON, P. Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions – An overview. **Plant Growth Regulation**. p. 12, 2000.

JIANG, S. et al. Bacterial effector activates jasmonate signaling by directly targeting JAZ transcriptional repressors. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003715, 31 out. 2013.

KAY, S.; BONAS, U. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. **Current Opinion in Microbiology**, Host–Microbe Interactions: Bacteria. v. 12, n. 1, p. 37–43, 1 fev. 2009.

KAZAN, K.; LYONS, R. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. **The Plant Cell**, v. 26, n. 6, p. 2285–2309, jun. 2014.

LIU, T. et al. Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 4686, 26 ago. 2014.

LIU, Y.-Y.; CHEN, H.-W.; CHOU, J.-Y. Variation in indole-3-acetic acid production by wild *Saccharomyces cerevisiae* and *S. paradoxus* strains from diverse ecological sources and its effect on growth. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0160524, 2 ago. 2016.

LLORENTE, F. et al. repression of the auxin response pathway increases *Arabidopsis* susceptibility to necrotrophic fungi. **Molecular Plant**, v. 1, n. 3, p. 496–509, 1 maio 2008.

LOBÃO, D. et al. Cacau cabruca – sistema agrossilvicultural tropical. **Ciência, tecnologia e manejo do cacaueiro**, p. 290–323, 2007.

MA, K.-W.; MA, W. Phytohormone pathways as targets of pathogens to facilitate infection. **Plant Molecular Biology**, v. 91, n. 6, p. 713–725, 1 ago. 2016.

MAOR, R. et al. In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1852–1854, 1 mar. 2004.

MARELLI, J.-P. et al. Infection biology of *Moniliophthora perniciosa* on *Theobroma cacao* and alternate Solanaceous hosts. **Tropical Plant Biology**, v. 2, n. 3, p. 149–160, 1 dez. 2009.

MATHESIUS, U. Auxin: at the root of nodule development? **Functional Plant Biology**, v. 35, n. 8, p. 651, 2008.

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

MELNICK, R. L. et al. The interaction of *Theobroma cacao* and *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease, during parthenocarpy. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, n. 6, p. 1261–1279, 1 dez. 2012.

MONDEGO, J. M. et al. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into witches' broom disease of cacao. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 548, 18 nov. 2008.

MOUBAYIDIN, L.; DI MAMBRO, R.; SABATINI, S. Cytokinin–auxin crosstalk. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 10, p. 557–562, 1 out. 2009.

MUTKA, A. M. et al. Auxin promotes susceptibility to *Pseudomonas syringae* via a mechanism independent of suppression of salicylic acid-mediated defenses. **The Plant Journal**, v. 74, n. 5, p. 746–754, 2013.

NAGPAL, P. et al. Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. **Development**, v. 132, n. 18, p. 4107–4118, 15 set. 2005.

NAVARRO, L. et al. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. **Science**, v. 312, n. 5772, p. 436–439, 21 abr. 2006.

OBERHÄNSLI, T.; DÉFAGO, G.; HAAS, D. 1991. Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. **Microbiology**, v. 137, n. 10, p. 2273–2279, 1991.

PANDOLFINI, T.; MOLESINI, B.; SPENA, A. Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 8, p. 327–329, ago. 2007.

PATKAR, R. N.; NAQVI, N. I. Fungal manipulation of hormone-regulated plant defense. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 6, p. e1006334, 15 jun. 2017.

PEREIRA, A. L. et al. Identification of putative TAL effector targets of the citrus canker pathogens shows functional convergence underlying disease development and defense response. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 157, 25 fev. 2014.

PIERRE, S. et al. Saprotrophic proteomes of biotypes of the witches' broom pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **Fungal Biology**, v. 121, n. 9, p. 743–753, 1 set. 2017.

PLETT, J. M. et al. Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 22, p. 8299–8304, 3 jun. 2014.

PLOETZ, R. C. Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1634–1639, dez. 2007.

PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 573–594, 1996.

QIN, X. et al. Gibberellin 20-oxidase gene OsGA20ox3 regulates plant stature and disease development in rice. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 26, n. 2, p. 227–239, fev. 2013.

REEVES, P. H. et al. A regulatory network for coordinated flower maturation. **PLOS Genetics**, v. 8, n. 2, p. e1002506, 9 fev. 2012.

REINEKE, G. et al. Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 3, p. 339–355, maio 2008.

RIBEIRO, J. C. Arquivos associados: impacto, excelência e produtividade das ciências agrárias no Brasil. v. 3, 2020.

ROBERT-SEILANIANTZ, A. et al. Pathological hormone imbalances. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, n. 4, p. 372–379, ago. 2007.

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

SCARPARI, L. M. et al. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 413, p. 865–877, mar. 2005.

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

SENAR. **Cacau: produção, manejo e colheita. Coleção Serviço Nacional de Aprendizagem Rural**. Disponível em: <https://www.cnabrasil.org.br/assets/arquivos/215-CACAU.pdf>. Acesso em: 1 nov. 2021.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 4, p. a001438, 1 abr. 2011.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 425–448, 1 jul. 2007.

SPOEL, S. H.; DONG, X. Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. **Cell Host & Microbe**, v. 3, n. 6, p. 348–351, jun. 2008.

SUGIO, A. et al. Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 48, p. E1254–E1263, 29 nov. 2011.

TANAKA, E. et al. Auxin production by the rice blast fungus and its localization in host tissue. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 7–8, p. 522–530, 2011.

TEIXEIRA, P. J. P. L. et al. High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **The Plant Cell**, v. 26, n. 11, p. 4245–4269, nov. 2014.

TEIXEIRA, P. J. P. L.; THOMAZELLA, D. P. DE T.; PEREIRA, G. A. G. Time for chocolate: current understanding and new perspectives on cacao witches' broom disease research. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 10, p. e1005130, 22 out. 2015.

TSAVKELOVA, E. et al. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium species*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 1, p. 48–57, 1 jan. 2012.

WANG, D. et al. Salicylic acid anhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. **Current Biology**, v. 17, n. 20, p. 1784–1790, 23 out. 2007.

WANG, H. et al. Research progresses on GH3s, one family of primary auxin-responsive genes. **Plant Growth Regulation**, v. 56, n. 3, p. 225–232, 1 dez. 2008.

WONG, J. et al. Roles of small RNAs in soybean defense against Phytophthora sojae infection. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 79, n. 6, p. 928–940, set. 2014.

YANG, D.-L. et al. Altered disease development in the EUI mutants and EUI overexpressors indicates that gibberellins negatively regulate rice basal disease resistance. **Molecular Plant**, v. 1, n. 3, p. 528–537, 1 maio 2008.

YANG, L. et al. *Pseudomonas syringae* type III effector HopBB1 promotes host transcriptional repressor degradation to regulate phytohormone responses and virulence. **Cell Host & Microbe**, v. 21, n. 2, p. 156–168, 8 fev. 2017.

YIN, C. et al. Characterization of a tryptophan 2-monooxygenase gene from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* involved in auxin biosynthesis and rust pathogenicity. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 27, n. 3, p. 227–235, mar. 2014.

ZHU, X. et al. *Verticillium dahliae's* isochorismatase hydrolase is a virulence factor that contributes to interference with potato's salicylate and jasmonate defense signaling. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 399, 2017.

2 OBJETIVO

A vassoura de bruxa constitui um dos principais fatores limitantes para a produção de cacau nas Américas, sendo de grande relevância para o Brasil. Esta doença é marcada pela ocorrência de drásticas alterações morfológicas no tecido infectado, o que sugere a participação de fitohormônios. De fato, trabalhos anteriores sugerem que a resposta à auxina é ativada em plantas infectadas por *M. perniciosa*. Entretanto, isso ainda foi pouco explorado. Desta forma, o principal objetivo deste projeto foi avaliar o papel da auxina no desenvolvimento da vassoura de bruxa e na virulência de *M. perniciosa*.

Nossa hipótese é que *M. perniciosa* produz auxina como estratégia de virulência, possivelmente para suprimir o sistema imune da planta e criar um nicho favorável para a infecção. Assim, as principais perguntas que embasam este projeto são: (1) O fungo *M. perniciosa* é capaz de produzir auxina? (2) Quais são os genes que determinam a via metabólica envolvida na biossíntese de auxina neste patógeno? (3) A produção de auxina por *M. perniciosa* é necessária para a infecção e para o desenvolvimento de sintomas no cacaueiro?

Dessa forma, o trabalho ramificou-se em duas principais frentes:

Capítulo I – O fungo *Moniliophthora perniciosa* produz auxina e interfere com a resposta hormonal do cacaueiro durante a vassoura de bruxa

Capítulo II – Manipulação genética do fungo *Moniliophthora perniciosa*

Os resultados que demonstram a produção de auxina por *M. perniciosa* são apresentados no Capítulo I. Uma vez que a avaliação do papel da auxina como um fator de virulência de *M. perniciosa* requer o estudo de mutantes incapazes de produzir este hormônio, dedicamos esforços para a implementação de técnicas de manipulação genética deste fungo. Como resultado, estabelecemos um procedimento eficiente para a transformação rotineira deste patógeno em nosso laboratório, algo até então indisponível entre os grupos que estudam a vassoura de bruxa. Estes resultados são apresentados no Capítulo II.

3 O FUNGO *Moniliophthora perniciosa* PRODUZ AUXINA E INTERFERE COM A RESPOSTA HORMONAL DO CACAUEIRO DURANTE A VASSOURA DE BRUXA

Resumo

A vassoura de bruxa constitui um dos principais fatores limitantes para a produção de cacau nas Américas, sendo de grande relevância para o Brasil. Notavelmente, plantas afetadas pela vassoura de bruxa desenvolvem marcantes alterações morfológicas, sugerindo a ocorrência de um desequilíbrio hormonal durante a infecção. Através de análises transcriptômicas da progressão da doença, verificamos que o aumento da expressão de genes responsivos ao hormônio auxina constitui uma das alterações moleculares mais notáveis em plantas infectadas. No entanto, genes do cacaueiro relacionados à produção de auxina não foram induzidos, sugerindo que esta resposta possa ser desencadeada diretamente pelo patógeno. Em concordância com essa hipótese, a investigação do genoma de *M. perniciosa* revelou genes que integram rotas candidatas para a biossíntese de IAA a partir de triptofano (Trp). De fato, culturas do fungo suplementadas com Trp acumularam ácido indol-3-acético (IAA) e foram capazes de ativar a resposta à auxina em folhas e raízes de *Arabidopsis thaliana* DR5::*GFP*. Análises de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) sugerem que a indol-3-acetamida (IAM) é um intermediário da biossíntese de IAA neste patógeno. Os resultados obtidos até o momento confirmam que *M. perniciosa* é capaz de produzir auxina e suportam a hipótese de que a resposta aumentada do cacaueiro a este hormônio durante a infecção seja uma consequência da auxina produzida pelo patógeno.

Palavra-chave: Auxina, Hormônio, Fungo, Cacau

Abstract

Witches' broom disease is one of the main limiting factors for cocoa production in the Americas, being of great relevance for Brazil. Notably, plants affected by witches' broom disease develop marked morphological changes, suggesting the occurrence of a hormonal imbalance during the infection. Through transcriptomic analyses of the disease progression, we verified that the increased expression of genes responsive to the hormone auxin constitutes one of the most notable molecular alterations in infected plants. However, cacao genes related to auxin production were not induced, suggesting that this response is directly triggered by the pathogen. In agreement with this hypothesis, the investigation of the *M. perniciosa* genome revealed genes that integrate candidate routes for the biosynthesis of IAA from tryptophan (Trp). Indeed, cultures of the fungus supplemented with Trp accumulated indole-3-acetic acid (IAA) and were able to activate the auxin response in *Arabidopsis thaliana* DR5::*GFP* leaves and roots. High performance liquid chromatography (HPLC) analyses suggest that indole-3-acetamide (IAM) is part of the IAA biosynthesis pathway in this pathogen. The results obtained so far confirm that *M. perniciosa* can produce auxin and support the hypothesis that the

increased response of cacao to this hormone during the infection is a consequence of pathogen-derived auxin.

Keywords: Auxin, Hormone, Fungus, Cacao

3.1 Introdução

A auxina é um fitohormônio com importante papel na regulação do desenvolvimento vegetal (FU; WANG, 2011). Esse hormônio é conhecido por estimular a divisão e elongação celular, promovendo o crescimento dos tecidos da planta, além de promover o desenvolvimento vascular e a manutenção e diferenciação de meristemas (FU; WANG, 2011; KAZAN; LYONS, 2014; MOUBAYIDIN; DI MAMBRO; SABATINI, 2009). Além do seu papel no desenvolvimento, a auxina é apontada como modulador do sistema imune das plantas (CHEN et al., 2007; MUTKA et al., 2013), atuando de forma antagônica ao ácido salicílico e, assim, promovendo suscetibilidade a patógenos biotróficos e hemibiotróficos (FU; WANG, 2011). Não é surpreendente, portanto, que patógenos tenham evoluído estratégias para manipular a sinalização celular mediada por auxina de forma a interferir com a imunidade e fisiologia de seus hospedeiros. Muitos microrganismos fitopatogênicos são capazes de produzir ácido indol-3-acético (IAA), a principal auxina encontrada em plantas. Por exemplo, bactérias que induzem a formação de galhas (e.g., *Agrobacterium*) produzem auxinas e citocininas para promover a infecção (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011). A ação conjunta destes hormônios leva a um crescimento exagerado do tecido infectado, o que contribui para o aumento da disponibilidade de nutrientes para o patógeno (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011). Em fungos, múltiplos estudos também indicam que a produção de auxina também pode ser uma estratégia de virulência. No fungo hemibiotrófico *Colletotrichum gloeosporioides f. s*p. *aeschynomene*, causador da antracnose na erva daninha *Aeschynomene virginica*, a produção de auxina foi relatada tanto na fase biótrofica quanto na fase necrotrófica (MAOR et al., 2004). No entanto, a produção é mais elevada na fase biotrófica, sugerindo que a produção de IAA por este patógeno possa ser importante durante os estágios iniciais da colonização da planta (MAOR et al., 2004). No fungo biotrófico *Puccinia graminis f.* sp*. tritici*, causador da ferrugem do trigo, a redução em duas vezes na transcrição da enzima triptofano 2-

monooxigenase, descrita como parte da via de indol-3-acetamida (IAM) na produção de IAA, levou à diminuição na formação de pústulas, sintomas característico da doença (YIN et al., 2014). Por outro lado, o fungo *Ustilago maydis*, causador do carvão no milho, também é conhecido por produzir e secretar auxina, mas esta é dispensável para a virulência e indução de tumores (REINEKE et al., 2008). Além da produção direta de IAA, patógenos também podem manipular vias de síntese e sinalização hormonal do hospedeiro (TSAVKELOVA et al., 2006). Por exemplo, o efetor AvrRpt2 da bactéria *Pseudomonas syringae* interage com e promove a degradação da proteínas Aux/IAA de *Arabidopsis thaliana*, o que resulta na de-repressão da resposta à auxina e induz suscetibilidade à infecção (CHEN et al., 2007). Apesar desses exemplos, a função do metabolismo de auxina no desenvolvimento de doenças ainda permanece pouco explorado e certamente varia de acordo com os organismos envolvidos.

O cacaueiro é uma planta originária da Bacia Amazônica (BAUM et al., 2004) que tem grande importância econômica por fornecer a matéria prima para a produção do chocolate, um produto apreciado mundialmente (PURDY; SCHMIDT, 1996). Apesar da sua importância econômica, múltiplas doenças de difícil controle afetam esta planta em todo mundo e ameaçam a indústria chocolateira. Em particular, a vassoura de bruxa, causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, é um dos principais fatores limitantes para a produção de cacau no continente americano (PLOETZ, 2007). O fungo *M. perniciosa* apresenta estilo de vida hemibiotrófico e infecta tecidos meristemáticos em atividade do hospedeiro (MEINHARDT et al., 2008; MONDEGO et al., 2008). Notavelmente, plantas afetadas pela vassoura de bruxa desenvolvem marcantes alterações morfológicas, sugerindo a ocorrência de um desequilíbrio hormonal durante a infecção. Ramos infectados apresentam crescimento exagerado e perda de dominância apical, resultando em estruturas conhecidas como “vassouras verdes”. A infecção de frutos resulta em amadurecimento desuniforme e deformação, enquanto a infecção de almofadas florais leva ao desenvolvimento de frutos partenocárpicos. Por ser um regulador central do desenvolvimento vegetal, a auxina vem sendo apontada como um possível determinante dos sintomas observados na vassoura de bruxa (EVANS, 1980). De fato, análises de expressão gênica em larga escala do cacaueiro infectado por *M. perniciosa* revelaram a forte indução de genes

responsivos à auxina, tanto em ramos como em almofadas florais (MELNICK et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2014). Ainda, a inoculação do biótipo-S de *M. perniciosa* (virulento em solanáceas) em tomateiro transgênico carregando o repórter DR5::*GUS* (o qual é ativado por auxina) também sugeriu a presença deste hormônio durante a infecção (MARELLI et al., 2009). Apesar dessas evidências, uma investigação detalhada acerca do papel da auxina no desenvolvimento dos sintomas da vassoura de bruxa e/ou na promoção da virulência de *M. perniciosa* ainda não foi realizada.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo investigar se a ativação da resposta a auxina em plantas infectadas é uma estratégia de virulência do fungo *M. perniciosa*. Uma análise transcriptômica da progressão da doença revelou que genes marcadores da resposta à auxina são ativados em paralelo ao desenvolvimento dos sintomas, sem que ocorra, no entanto, indução de genes envolvidos na biossíntese deste hormônio. A investigação do genoma do patógeno *M. perniciosa* revelou genes que integram rotas candidatas para a biossíntese de IAA a partir do triptofano (Trp). De fato, o cultivo de *M. perniciosa* na presença deste aminoácido levou ao acúmulo de auxina biologicamente ativa, confirmando o potencial deste fungo em produzir este hormônio. Os resultados obtidos até o momento suportam a hipótese de que a resposta aumentada à auxina em cacaueiros infectados nos estágios iniciais da doença seja uma consequência da auxina produzida pelo fungo *M. perniciosa*.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Inoculação de plântulas de cacaueiro com *M. perniciosa*

O cultivar ‘Comum’ (genótipo Forastero) de *Theobroma cacao* e o isolado BP10 de *Moniliophthora perniciosa* foram utilizados nos experimentos de infecção de plântulas. As plantas foram cultivadas por aproximadamente três meses em casa de vegetação sob temperatura média de 26°C, umidade acima de 80% e fotoperíodo de 12 h. Os meristemas apicais ativos foram inoculados com 30 µL de uma suspensão de basidiósporos (10^5 esporos/mL), seguindo os procedimentos descritos por Frias et al. (1995). Após 20, 30 e 45 dias, os tecidos infectados foram excisados e usados para a extração de RNA. Como controles, os tecidos correspondentes de plântulas não

inoculadas foram coletados em paralelo. Ao menos três réplicas biológicas foram usadas para cada condição.

3.2.2 Extração do RNA e preparo de bibliotecas para RNA-seq

A extração de RNA foi realizada segundo os procedimentos descritos por Azevedo e colaboradores (2003). Para cada amostra, 5 µg de RNA total foram utilizados no preparo de bibliotecas de RNA-seq segundo o kit TruSeq RNA Sample Prep (Illumina). O controle de qualidade e quantificação das bibliotecas foi realizado com um chip Experion DNA 1K (Bio-Rad) e o fluorímetro Qubit (Thermo), respectivamente. As bibliotecas foram sequenciadas em instrumentos Illumina HiSeq2000.

3.2.3 Processamento de *reads* de RNA-seq e identificação de genes diferencialmente expressos

A avaliação inicial da qualidade das sequências obtidas foi realizada com FastQC versão 0.11.7 (ANDREWS, 2010). O programa Trimmomatic versão 0.36 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) foi usado para remover sequências contendo adaptadores. *Reads* de alta qualidade foram então alinhados contra a versão 2.1 do genoma do cacaueiro utilizando HISAT2 versão 2.1.0 (KIM; LANGMEAD; SALZBERG, 2015) com parâmetros padrão. A função *featureCounts* do pacote Subread versão 1.6.3 (LIAO; SMYTH; SHI, 2013) foi usada para contar os *reads* que mapearam em cada um dos 27,379 genes codificadores de proteínas. A identificação de genes diferencialmente expressos foi realizada usando a abordagem baseada em modelos lineares generalizados (glm) (MCCARTHY; CHEN; SMYTH, 2012) implementada no pacote edgeR do R (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010). Genes com um nível mínimo de expressão de 1 contagem por milhão (CPM) em pelo menos três bibliotecas foram considerado expressos no experimento. Aqueles genes que não alcançaram este *threshold* de expressão foram removidos das análises subsequentes. A normalização foi realizada pelo método *trimmed mean of M-values* (TMM; função calcNormFactors no edgeR) (ROBINSON; OSHLACK, 2010). A função glmFit foi usada para ajustar as contagens a um modelo linear generalizado binomial negativo com uma função de log

link. Neste experimento, nosso objetivo foi avaliar a resposta transcricional de plântulas de cacaueiro ao fungo *M. perniciosa*. Para isso, empregamos um modelo de *layout* unilateral para comparar plantas infectadas com seus respectivos controles (plantas não infectadas) em cada um dos três pontos de coleta, ou seja, 20, 30 e 45 dias após a infecção (dai). O método de Benjamini-Hochberg (*False Discovery Rate*; FDR) foi usado para a correção de múltiplas comparações (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995). Genes com um FDR menor ou igual a 0.01 e *fold-change* de pelo menos 2x foram considerados diferencialmente expressos no experimento. A clusterização hierárquica de genes de interesse foi realizada com o pacote ComplexHeatmap no R (GU; EILS; SCHLESNER, 2016) com base em distância euclidiana e método de agrupamento de ligação completa (*complete linkage*). Os valores de expressão gênica em TPM (*Transcripts per million*) foram normalizados em *z-scores* para essas análises. Análises de enriquecimento de termos GO (*Gene Ontology*) e InterPro foram realizadas com a função compareCluster do pacote clusterProfiler em R (YU et al., 2012). Um valor de FDR menor ou igual a 0.05 foi utilizado para a determinação de termos enriquecidos.

3.2.4 Quantificação de compostos indólicos em culturas de *M. perniciosa*

O isolado FPN1 de *M. perniciosa* foi utilizado nos experimentos de quantificação de compostos indólicos *in vitro*. Para isso, o micélio foi inicialmente inoculado em 100 mL de meio *Malt light* líquido (1.7 g/L de extrato de malte, 5 g/L de extrato de levedura e 50 mL de glicerol) e mantido em *shaker* a 28°C e agitação constante de 200 rpm por 12 dias. Após esse período, o fungo foi separado com uma peneira e lavado com água destilada estéril. Seis porções de 1 g de micélio foram então transferidas para seis novos frascos Erlenmeyers contendo 45 mL de meio *Malt light* líquido cada. Três destes frascos foram suplementados com 5 mL de uma solução filtrada de triptofano 50 mM, resultando em uma concentração final de 5 mM do aminoácido. Os outros três frascos receberam 5 mL de água estéril (condição controle). Além destes tratamentos, três frascos contendo *Malt light* suplementados com 5 mM de triptofano, mas sem inoculação do fungo, foram incluídos no experimento como um segundo controle. O experimento foi realizado três vezes independentemente, totalizando 9 réplicas biológicas por condição.

Os frascos foram mantidos em *shaker* a 28°C sob e agitação constante de 200 rpm por 21 dias. Durante esse período, nos dias 0 (imediatamente após a inoculação), 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 de cultivo, alíquotas de 500 µL do meio de cultura foram retiradas e armazenadas a -20°C em tubos de 1.5 mL para posterior quantificação de compostos indólicos. Para isso, uma alíquota de 100 µL de cada sobrenadante foi misturada com 100 µL do reagente de Salkowski (1 mL de solução de cloreto férrico 0.5 M e 49 mL de ácido perclórico 35%) em uma placa de 96 poços (GANG et al., 2019). Uma curva padrão de oito pontos foi construída utilizando-se uma diluição seriada de ácido indol-3-acético puro (Sigma). A leitura de absorbância foi realizada em um leitor de placas modelo Infinite 200 PRO (Tecan), o qual foi programado para incubar as amostras por 30 minutos a 30°C antes da leitura da absorbância em um comprimento de onda de 536 nm.

Experimentos adicionais em que o fungo (isolado FPN1) foi suplementado com diferentes concentrações de triptofano (1, 2, 3, 4, 5, 7 e 10 mM) também foram realizados segundo os mesmos procedimentos descritos acima a fim de verificarmos como a produção de compostos indólicos pelo fungo varia em função da quantidade do substrato (i.e., Trp) disponível. Neste caso, as medições de compostos indólicos foram realizadas no dia da inoculação (dia 0), e após 10 e 21 dias de cultura. Este experimento foi realizado duas vezes independentemente, cada uma contendo três réplicas e, assim, totalizando seis réplicas biológicas por condição. Por fim, também avaliamos a produção de compostos indólicos utilizando uma coleção de 10 isolados de *M. perniciosa* (5 biótipo-C, 4 biótipo-S e 1 biótipo-L). Este experimento foi realizado em um volume de 10 mL de meio *Malt light* (com ou sem 5 mM de Trp) inoculado com 0.2 g de micélio. As medições de compostos indólicos foram realizadas no dia da inoculação (dia 0), e após 10 e 21 dias de cultura. Três réplicas biológicas foram realizadas por condição. As análises estatísticas destes experimentos foram realizadas com o teste ANOVA e Tukey post hoc utilizando-se o pacote AGRICOLAE versão 1.4.0 (MENDIBURU; YASEEN, 2020) em R**.**

3.2.5 Avaliação da resposta a auxina em *Arabidopsis thaliana* DR5::*GFP*

Sementes de *Arabidopsis thaliana* carregando o cassete repórter DR5::*GFP* (FRIML et al., 2003) foram desinfetadas com uma solução de limpeza (água sanitária a

70% e Tween-20 a 0.2%) por 10 minutos e então lavadas em água estéril três vezes. Cerca de 10 sementes foram então transferidas para cada poço de uma placas de 12 poços contendo 1 mL de meio MS (sais Murashige & Skoog com vitaminas, 0.5 g/L MES hidrato e 0.5% sacarose; pH 5.7) (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Após estratificação a 4°C, as placas foram transferidas para uma câmara de crescimento com temperatura média de 22°C, umidade de aproximadamente 40% e um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas no escuro. Decorridos sete dias, o meio de cultura foi substituído por 1 mL do sobrenadante de culturas de *M. perniciosa* (ou controles) (Tabela 1; Figura 9). Após 24h de incubação na câmara de crescimento, as plântulas foram visualizadas em microscópio confocal Olympus FV1000 e analisadas no programa Olympus Fluoview FV10-ASW. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata e o experimento foi repetido três vezes independentes. As imagens foram tomadas com lente objetiva de 20X sob excitação de 488 nm e detecção de fluorescência em 550 nm. A sensibilidade do detector foi ajustada para 550 nm e as imagens capturadas a velocidades de 100 µs / pixel. A intensidade de GFP foi quantificada nas imagens produzidas utilizando-se o software ImageJ (RASBAND, 1997).

Tabela 1. Tratamentos realizados para avaliar a sinalização de auxina em *Arabidopsis thaliana* DR5::*GFP*.

Tratamentos
Meio *Malt light* incubado em *shaker* por 21 dias.
Meio *Malt light* incubado em *shaker* por 21 dias e então suplementado com 100 mM IAA
Meio *Malt light* suplementado com 5 mM de Trp e incubado em *shaker* por 21 dias.
Meio *Malt light* inoculado com *M. perniciosa* e incubado em *shaker* por 21 dias.
Meio *Malt light* suplementado com 5 mM de Trp, inoculado com *M. perniciosa* e incubado em *shaker* por 10 dias.
Meio *Malt light* suplementado com 5 mM Trp, inoculado com *M. perniciosa* e incubado em *shaker* por 21 dias

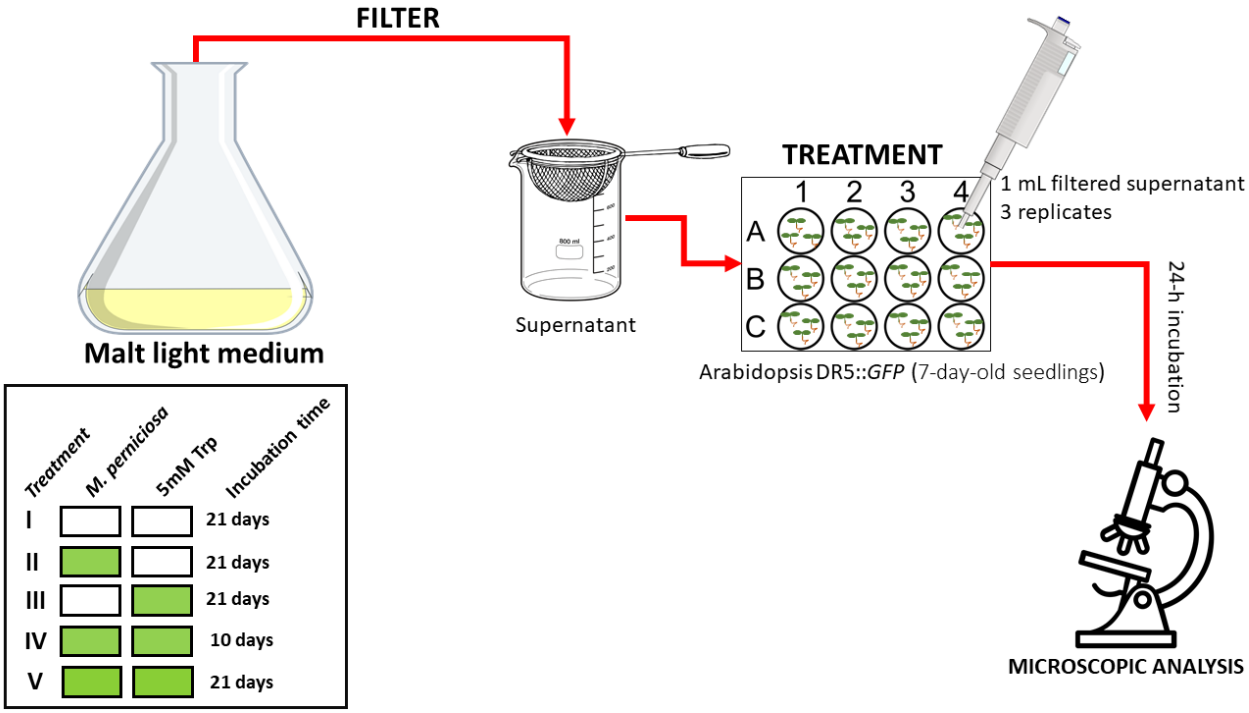

Figura 8. *Design* do experimento realizado para avaliar a sinalização de auxina em *Arabidopsis thaliana* DR5::*GFP*. Os fracos de cada tratamento (ver caixa de legenda) foram incubados por 10 ou 21 dias. Após esse período, as amostras foram filtradas em peneira e em filtro 0.22 uM. Então,1 mL do sobrenadante livre de células foi adicionado em triplicata a uma placa de 12 poços contento plântulas de *Arabidopsis thaliana* DR5::*GFP* de 7 dias de idade. Após 24h de incubação, as raízes e os cotilédones da planta foram visualizados em microscópio confocal.

3.2.6 Detecção de IAA em culturas de *M. perniciosa* através de Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Sobrenadantes de culturas de *M. perniciosa* foram centrifugados a 28,960 x g por 10 min, acidificados a pH 4 com HCl 1M e misturados com o dobro do volume de acetato de etila. Após duas extrações, a fração orgânica foi transferida a um balão de 250 mL e evaporada sob vácuo a 40°C em um rotoevaporador. O extrato resultante foi dissolvido em 5 mL de 10% de etanol e passado por um filtro de 0.22 µM.

A quantificação de IAA e de seus precursores foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com base no método descrito por NUMPONSAK e colaboradores (2018). As análises foram realizadas no instrumento DGU-20A3 (Shimadzu) equipado com uma coluna C18 Waters Spherisorb ODS2 (250 × 4,6 mm, 5 µm) aquecida a 40˚C. O volume de injeção foi 50 µL e as leituras foram

realizadas no comprimento de onda de 280 nm, com referência de 350 nm (largura de banda de 100 nm). A fase móvel consistiu em um gradiente de dois solventes. O solvente A foi composto por 2.5% de ácido acético em água Milli-Q. O pH foi ajustado para pH 3,8 com KOH 10 M. O solvente B foi composto por 80% de acetonitrila em água Milli-Q. A fase móvel se iniciou com uma proporção de 80:20% (A:B), mudando para 50: 50%, 0:100% e 80:20% em 29, 35 e 37 min, respectivamente. O fluxo da fase móvel foi ajustado para 0,5 mL/min e o tempo total da corrida foi de 52 min. A identificação e quantificação de IAA e de seus precursores na cultura do fungo foi realizada comparando-se o tempo de retenção e área dos picos das amostras com a curva padrão construída a partir dos padrões de L-Trp, IAA, IAM, TAM e IAN em 10% de etanol.

3.3 Resultados

3.3.1 Investigando a interação biotrófica entre o cacaueiro e o fungo *M. perniciosa*

Uma das características mais marcantes da vassoura de bruxa é a sua fase biotrófica atipicamente longa. Em plântulas, os primeiros sintomas da doença (ramos inchados) são observados cerca de 20 dai, ao passo que a necrose do tecido infectado é iniciada apenas após 40 dias. Em um trabalho anterior, Teixeira e colaboradores (2014) descreveram alterações moleculares, bioquímicas e histológicas que ocorrem em uma vassoura verde típica 30 dias após a inoculação. Os resultados apontaram características que se correlacionam com os sintomas observados em plantas infectadas, incluindo alteração na transcrição de genes responsivos a hormônios. No entanto, tal análise se restringiu a apenas um momento da doença.

Para expandir nosso entendimento acerca da progressão das alterações moleculares durante o desenvolvimento da vassoura verde, utilizamos RNA-seq de forma a avaliar o transcriptoma de plantas infectadas (e seus respectivos controles sadios) em três momentos da fase biotrófica da doença (Figura 10): início dos sintomas (20 dai; 3 réplicas), vassoura verde madura (30 dai; 5 réplicas), início da necrose (45 dai; 3 réplicas). Em média, 95% dos *reads* obtidos para cada biblioteca alinharam exatamente uma vez na montagem do genoma do cacaueiro (versão 2.1, cultivar

Matina 1-6). Dentre os 27.379 genes anotados, 17.990 foram considerados expressos nas condições analisadas (i.e., tiveram ao menos 1 contagem por milhão em pelo menos 3 amostras).

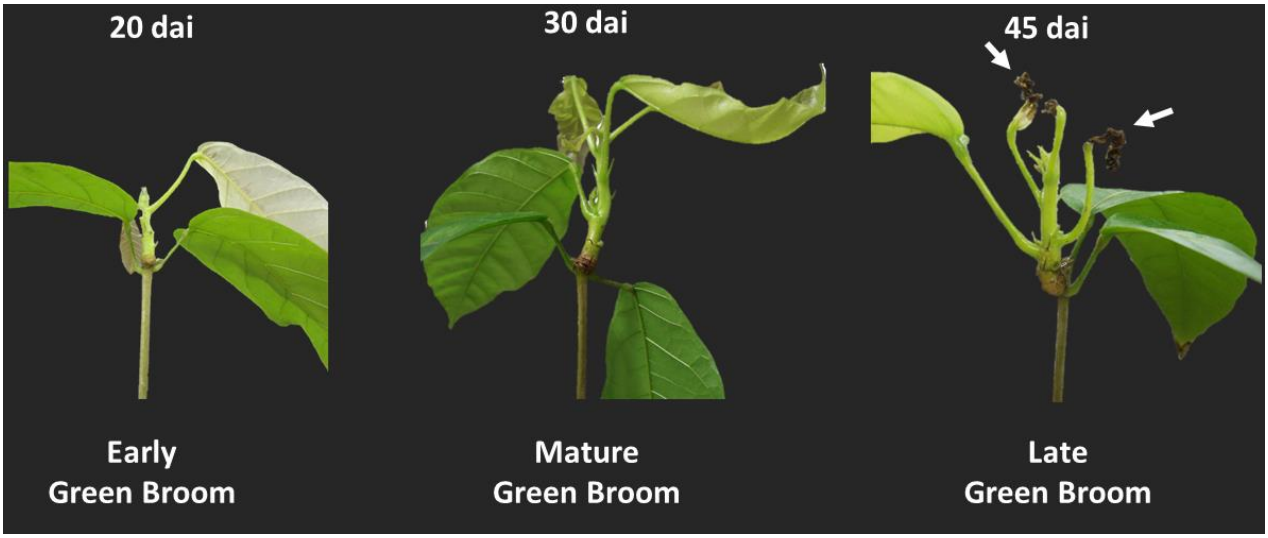

Figura 9. Fenótipos das plantas utilizadas no experimento de sequenciamento de transcriptomas. A inoculação de ramos do cacaueiro com esporos do fungo *M. perniciosa* resulta no desenvolvimento de uma estrutura anormal conhecida como "vassoura verde", a qual é caracterizada por intenso crescimento, hipertrofia e perda de dominância apical. Os primeiros sintomas (inchamento e alongamento do ramo) se desenvolvem após cerca de 20 dai. A necrose do ramo infectado se inicia pelas folhas jovens (setas) após cerca de 45 dai.

Uma análise de componentes principais (PCA; *principal component analysis*) demonstrou que a maior parte (48.63%) da variação entre as amostras do experimento é explicada pela infecção, indicando que os transcriptomas de plantas infectadas e sadias são claramente diferentes, independentemente do momento da infecção (Figura 10).

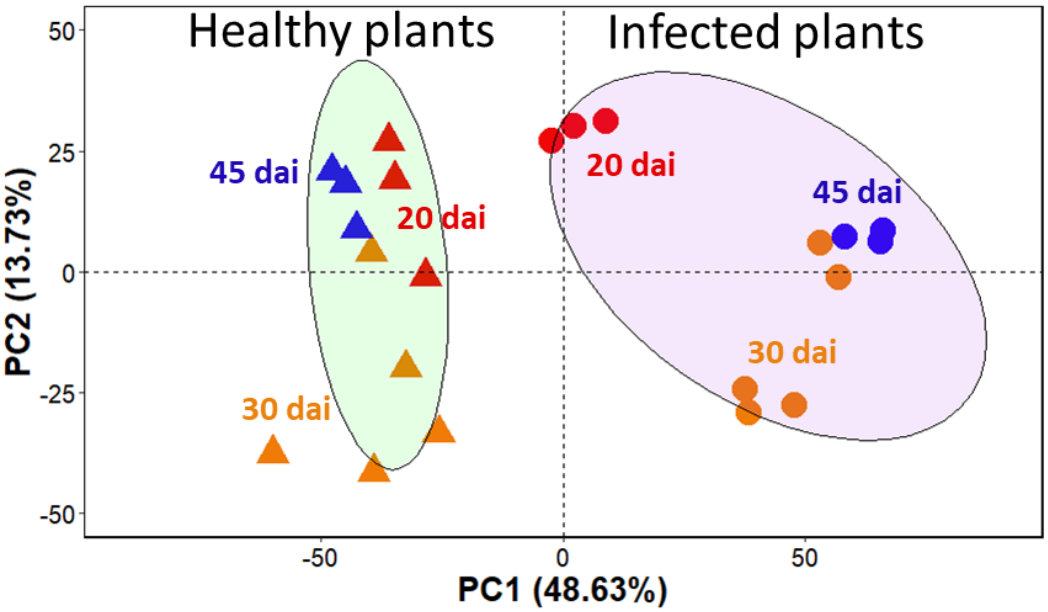

Figura 10. A doença vassoura de bruxa altera a regulação transcricional de ramos infectados. PCA baseada nos 500 genes com maior variância entre as amostras do experimento. Nota-se a separação em dois grupos principais. O primeiro grupo (elipse verde) inclui as plantas sadias (triângulos). O segundo grupo (elipse roxa) é formado pelas plantas infectadas (círculos). Os genes foram avaliados em diferentes tempos do experimento: 20 dai (vermelho), 30 da i(laranja) e 45 dai (azul). As elipses representam o centro de massa que contém pelo menos 80% dos dados de cada grupo.

A comparação entre plantas infectadas e não infectadas levou à identificação de 3904 genes diferencialmente expressos em pelo menos um ponto do experimento (*false discovery rate* [FDR] ≤ 0.01 e *fold-change* de pelo menos 2x). Uma menor quantidade de genes responsivos à infecção foi identificada na fase inicial da doença (20 dai, 477 genes), quando os sintomas ainda são brandos. Por outro lado, milhares de genes foram diferencialmente expressos nos estágios mais avançados (30 dai: 3105 genes; 45 dai: 2283 genes) (Figura 11A). Cerca de 70% dos genes induzidos (Figura 11B) ou reprimidos (Figura 11C) foram diferencialmente expressos em apenas um dos momentos da doença, indicando uma progressão nas alterações moleculares da planta ao longo do desenvolvimento da vassoura verde.

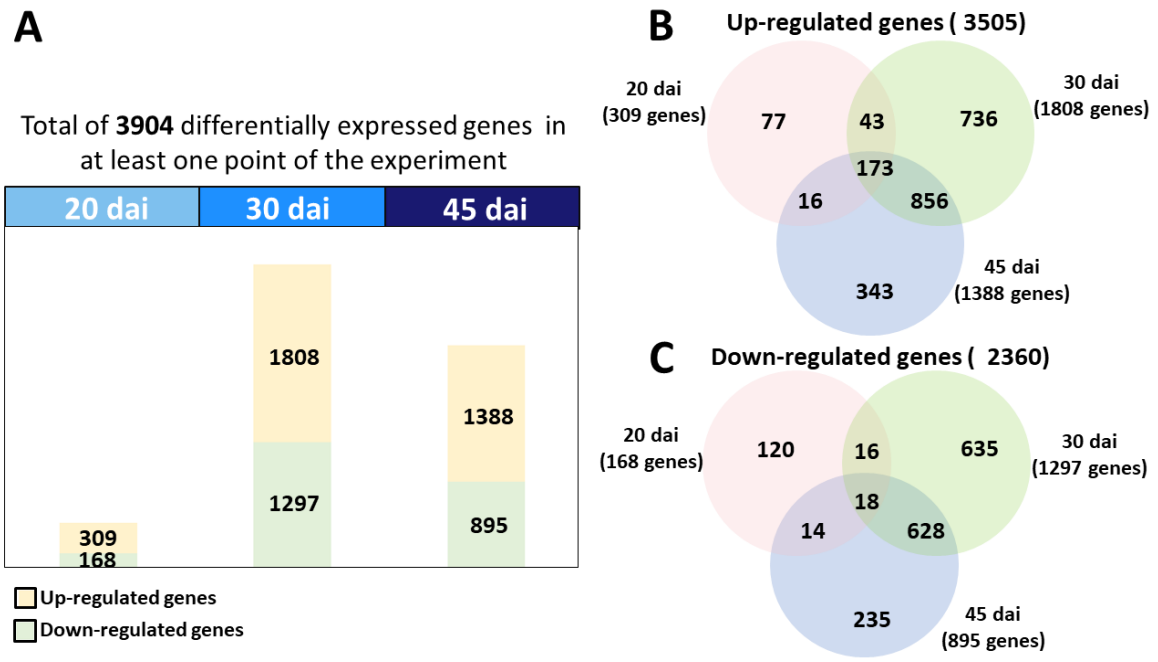

Figura 11. Genes diferencialmente expressos durante o desenvolvimento da vassoura verde. (A) Número de genes com expressão alterada em resposta à infecção em cada ponto do experimento (20, 30, 45 dai. (B) Diagrama de Venn dos 3505 genes induzidos em pelo menos um dos pontos avaliados. (C) Diagrama de Venn dos 2360 genes reprimidos em pelo menos um dos pontos avaliados.

3.3.2 Genes responsivos a auxina são induzidos em plantas infectadas

Para obter uma visão global das alterações moleculares que ocorrem em plantas infectadas, nós realizamos análises de enriquecimento de termos de *Gene Ontology* (GO; processos biológicos) e InterPro (famílias e domínios de proteínas) utilizando os genes diferencialmente expressos em cada um dos três estágios da vassoura verde. Processos biológicos relacionados com desenvolvimento, imunidade e metabolismo hormonal foram induzidos pela doença (Figura 12A). Por outro lado, termos referentes à fotossíntese foram encontrados entre os genes reprimidos, confirmando e estendendo a observações feitas por Teixeira e colaboradores (2014) de que plantas infectadas pela vassoura de bruxa apresentam menor taxa fotossintética. Notavelmente, termos envolvidos com a resposta e sinalização por auxina estão entre os processos biológicos induzidos em plantas infectadas, especialmente após 30 e 45 dai, quando o crescimento exagerado do tecido infectado é mais evidente. Análises de enriquecimento de domínios e famílias de proteínas suportam essas conclusões, apontando que transportadores de auxina, bem como domínios/famílias relacionados à resposta a esse hormônio se encontraram induzidos (Figura 12B).

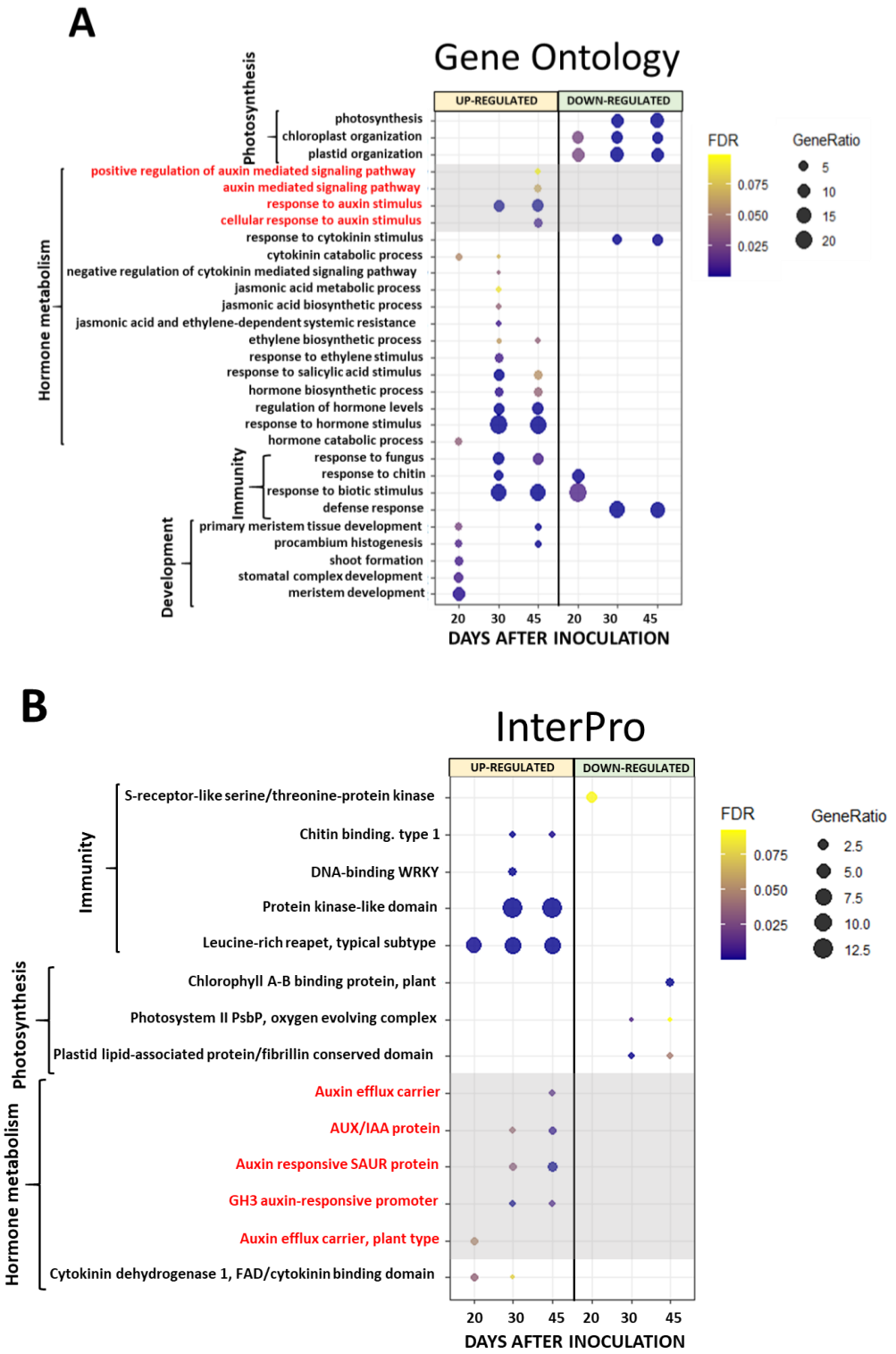

Figura 12. Processos biológicos e domínios/famílias de proteínas relacionados ao metabolismo de auxina são ativados durante a fase biotrófica da vassoura de bruxa. (A) Processos biológicos (termos GO; *Gene Ontology*) enriquecidos nos conjuntos de genes induzidos ou reprimidos pela infecção. (B) Domínios e famílias de proteínas (termos InterPro) que são enriquecidos nos conjuntos de genes induzidos ou reprimidos pela infecção. É possível observar a presença de termos relacionados à resposta ao hormônio auxina (marcados em vermelho e sombreados) em ambos os casos.

Em plantas, três famílias gênicas são reconhecidas por responderem à auxina: *Aux/IAA* (*auxin/indole-3-acetic acid protein*), *GH3* (*Glycoside Hydrolase* 3) e *SAUR* (*small auxin-up RNA*). A inspeção do genoma do cacaueiro levou à identificação de 36 *Aux/IAA*, 25 *GH3* e 87 *SAUR*. Tais genes foram então utilizados como marcadores da resposta à auxina em nosso experimento. Em concordância com a análise de enriquecimento de termos InterPro (Figura 12B), múltiplos membros destas famílias foram diferencialmente expressos em vassouras verdes (Figura 13). Notavelmente, quase todos estes genes foram regulados positivamente nas plantas infectadas. Ainda, a indução destes marcadores foi mais intensa nos estágios mais avançados (30 e 45 dai), quando as plantas apresentam evidentes alterações morfológicas. Assim, nossos resultados indicam uma correlação entre a intensidade da resposta a este hormônio e o estabelecimento dos sintomas da doença.

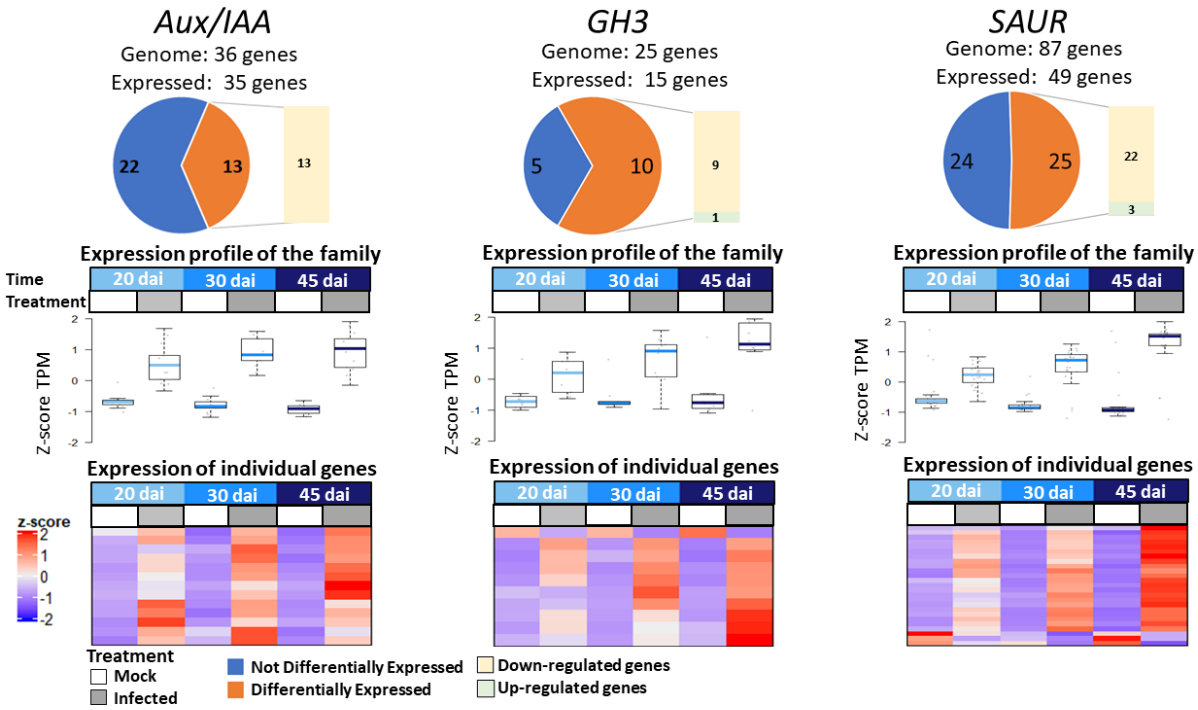

Figura 13. Genes responsivos a auxina são mais expressos em ramos infectados pela vassoura de bruxa. Genes pertencentes às famílias *Aux/IAA*, *GH3* e *SAUR* são marcadores da resposta à auxina em plantas. Estas três famílias são induzidas em plantas infectadas, sugerindo que *M. perniciosa* cause a ativação do metabolismo de auxina do hospedeiro durante a fase biotrófica da vassoura de bruxa. Os gráficos na parte superior mostram a proporção de genes de cada família, dentre os expressos, que responderam à infecção (induzidos: roxo; reprimidos: verde). A parte inferior mostra o perfil de expressão destas famílias nos três momentos analisados (20 dai, 30 dai e 45 dai).

3.3.3 Genes do cacaueiro envolvidos na biossíntese de auxina não são induzidos pela doença

A biossíntese de IAA em plantas pode ocorrer de forma dependente ou independente de triptofano (Trp). Na biossíntese dependente de Trp, a mais importante, quatro vias já foram propostas: a via da indol-3-acetamida (IAM), a via da triptamina (TAM), a via da indol-3-acetaldoxima (IAOX), e a via do ácido indol-3-pirúvico (IPyA) (CAO et al., 2019). Por outro lado, genes que participam de vias independentes de triptofano ainda não foram descritos. Com base nas rotas biossintéticas descritas em *Arabidopsis thaliana*, definimos genes de *Theobroma cacao* possivelmente envolvidos na biossíntese de auxina em cada uma das quatro vias dependentes de Trp. A partir disso, verificamos que três das quatro vias possuem genes expressos em nosso experimento (IAOX, IAM e a IPyA). A via IPyA, considerada a principal em plantas, possui sete genes candidatos expressos, porém, apenas um deles é diferencialmente expresso e, ainda, regulado negativamente em 45 dai (Figura 14). A via IAM possui apenas dois genes candidatos expressos em nosso experimento, sendo um deles diferencialmente expresso e regulado negativamente em 30 dai (Figura suplementar 1). Já a via IAOX possui treze genes candidatos expressos, sendo dois genes diferencialmente expressos. Um desses genes está regulado negativamente em 45 dai, enquanto o outro, que codifica uma provável nitrilase, esta regulada positivamente em 30 dai (Figura suplementar 2). Em conjunto, esses resultados sugerem que nenhuma das rotas de biossíntese de auxina dependente de Trp está induzida em plantas infectadas.

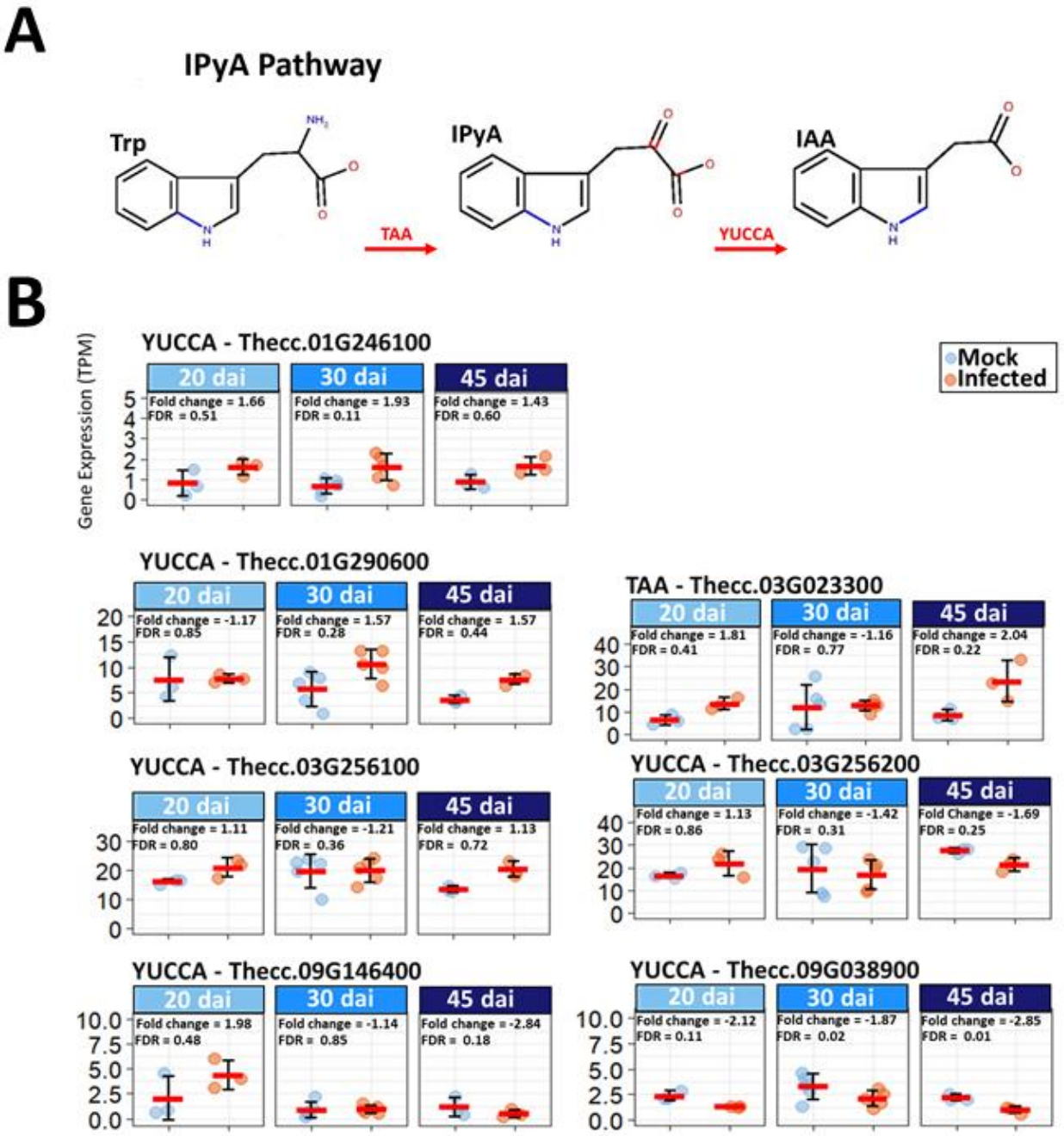

Figura 14. A principal via de biossíntese de auxina em plantas (IPyA) não é induzida em caucaueiro infectado com a vassoura de bruxa. (A) A via do IPyA é composta por duas enzimas e envolve a conversão de triptofano (Trp) em indopiruvato (IPyA) e, então, em ácido indo-3-acético (IAA). (B) Genes do cacaueiro expressos em nosso experimento e potencialmente pertencentes a essa rota são apresentados. Dentre eles, apenas um é diferencialmente expresso (YUCCA – Thecc.09G038900), sendo reprimido em plantas infectadas no tempo de 45 dai. Isto sugere que essa via, assim como as demais (Figura suplementar 1 e 2) não é ativada transcricionalmente durante o estágio biotrófico da doença.

3.3.4 *M. perniciosa* possui genes potencialmente envolvidos na biossíntese de auxina

O aminoácido triptofano é o precursor do ácido indol-3-acético (IAA), a principal auxina encontrada na natureza. Ao menos quatro rotas biossintéticas são utilizadas por microrganismos na produção deste hormônio (DI et al., 2016). A análise do genoma de *M. perniciosa* revelou genes com potencial de integrar todas essas rotas (Figura 15). Esta busca foi realizada de maneira pouco estringente com o objetivo de evitarmos falsos negativos. Enquanto alguns genes codificam enzimas de famílias bastante grandes e com múltiplos papéis biológicos (e.g., citocromos P450), outros possuem papel mais restrito (e.g., nitrilases, IPA descarboxilase, Trp descaboxilase) e são ótimos candidatos a membros de uma possível rota bioquímica dedicada à síntese de auxina.

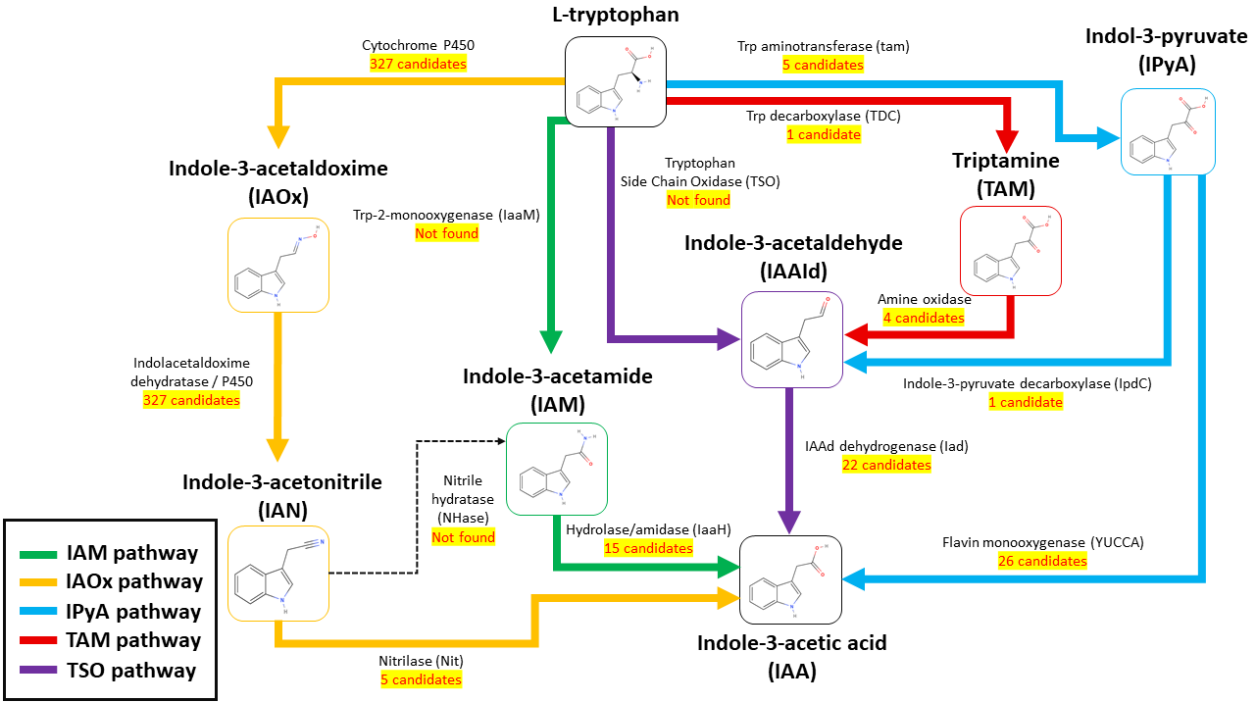

Figura 15. *M. perniciosa* possui genes candidatos para a síntese da auxina ácido indol-3-acético (IAA) a partir de triptofano (Trp). Quatro vias são reconhecidas com base nos intermediários produzidos. Plantas produzem IAA majoritariamente através da via do IPyA (azul) utilizando flavina monooxigenases (YUCCA) e índole-3-piruvato descarboxilase (Ipcd). As demais vias podem ser encontradas em microrganismos. A análise do genoma do fungo *M. perniciosa* revelou genes candidatos em todas as quatro vias (números indicados em amarelo). Este mapeamento foi realizado de forma pouco estringente (i.e., incluindo todos os membros de cada família gênica) de maneira a revelar toda e qualquer via metabólica potencialmente responsável pela síntese de IAA neste microrganismo.

3.3.5 Produção de composto indólicos por *M. perniciosa.*

Em concordância com a potencial capacidade de produção de IAA por *M. perniciosa*, o cultivo do fungo (isolado FPN1) na presença de 5 mM de triptofano resultou no acúmulo de compostos indólicos no meio de cultura (Figura 16A). Este acúmulo não foi observado em culturas não suplementadas, nem em meio contendo triptofano sem a inoculação do fungo. A produção de compostos indólicos se manteve crescente por pelo menos 21 dias de cultivo. Notavelmente, quanto maior a quantidade de triptofano disponibilizada ao fungo, maior a quantidade de compostos indólicos detectados no sobrenadante da cultura (Figura 16B), o que é consistente com o uso de triptofano como precursor destes compostos.

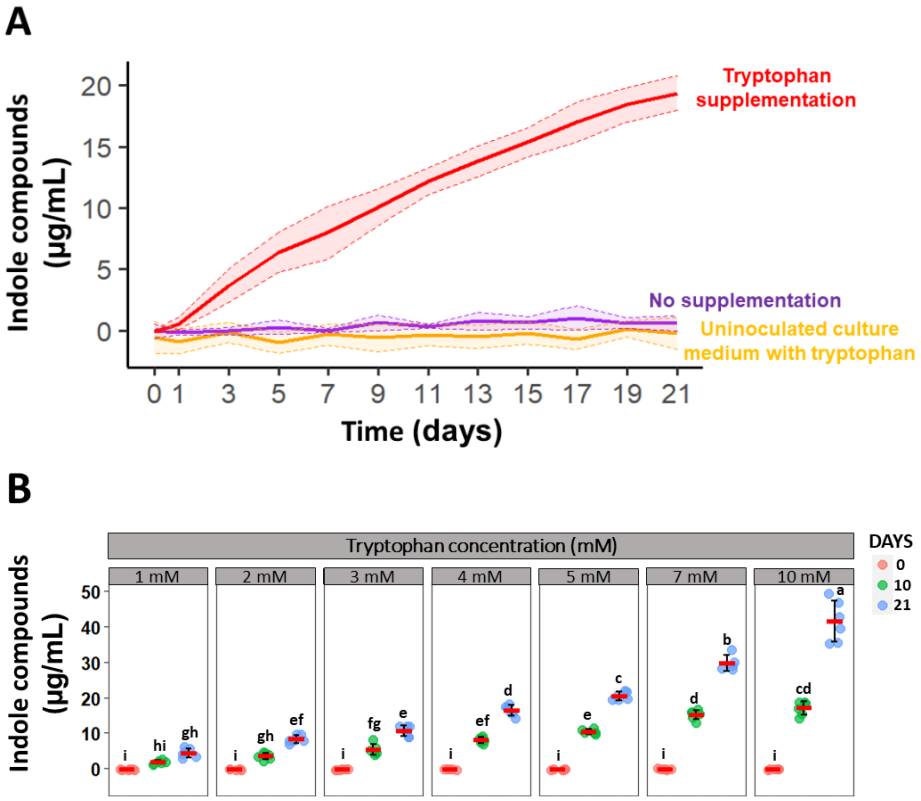

Figura 16. O fungo *M. perniciosa* produz compostos indólicos quando suplementado com triptofano (Trp). (A) Quantificação de compostos indólicos em meio *Malt light* ao longo de 21 dias de cultivo. Neste experimento, três condições foram avaliadas: (I) Meio de cultura suplementado com 5 mM de Trp e inoculado com o fungo (vermelho), (II) Meio de cultura não suplementado e inoculado com o fungo (roxo), (III) Meio de cultura suplementado com 5 mM de Trp mas não inoculado com o fungo (amarelo). As linhas representam a média de nove réplicas biológicas e as sombras o desvio padrão. (B) Quantificação de compostos indólicos no meio de cultura de *M. perniciosa* em função da concentração de Trp. As medições foram realizadas no início do experimento (dia 0) e após 10 e 21 dias de cultivo. As linhas vermelhas representam a média de seis réplicas biológicas. O teste ANOVA unidirecional seguido por uma análise post hoc de Tukey foi realizado. Tratamentos com a mesma letra acima do gráfico são estatisticamente indistinguíveis em um grau de confiança de 95%.

Com o objetivo de avaliar uma potencial variação natural na produção de compostos indólicos por diferentes isolados de *M. perniciosa*, utilizamos uma coleção de 10 isolados representativos de genótipos oriundos de diferentes hospedeiros e localidades da América Latina. Devido ao grande número de frascos necessários para este experimento (10 isolados x 2 tratamentos x 3 réplicas), avaliamos inicialmente a possibilidade de escalar o experimento para volumes menores de forma a realizarmos um maior número de tratamentos em um mesmo espaço físico. Os experimentos iniciais foram realizados em frascos de 125 mL contendo 50 mL de meio *Malt Light* inoculados com 1 g de micélio (Figura 16). Notavelmente, não houve diferença na concentração final de compostos indólicos quando reduzimos o volume e a massa de inóculo de maneira proporcional (Figura 17A). Dessa forma, o *screening* utilizando nossa coleção de isolados de *M. perniciosa* (Figura 17B) foi realizado em frascos de 50 mL contendo 10 mL de meio *Malt light* inoculados com 0,2 g de micélio. Apesar da quantidade variar entre os isolados, identificamos produção de composto indólicos por todos os isolados testados (Figura 17B). Ainda, nenhuma diferença significativa foi observada em função do biótipo do fungo (10 dias: $p = 0.182$; 21 dias: $p = 0.0914$).

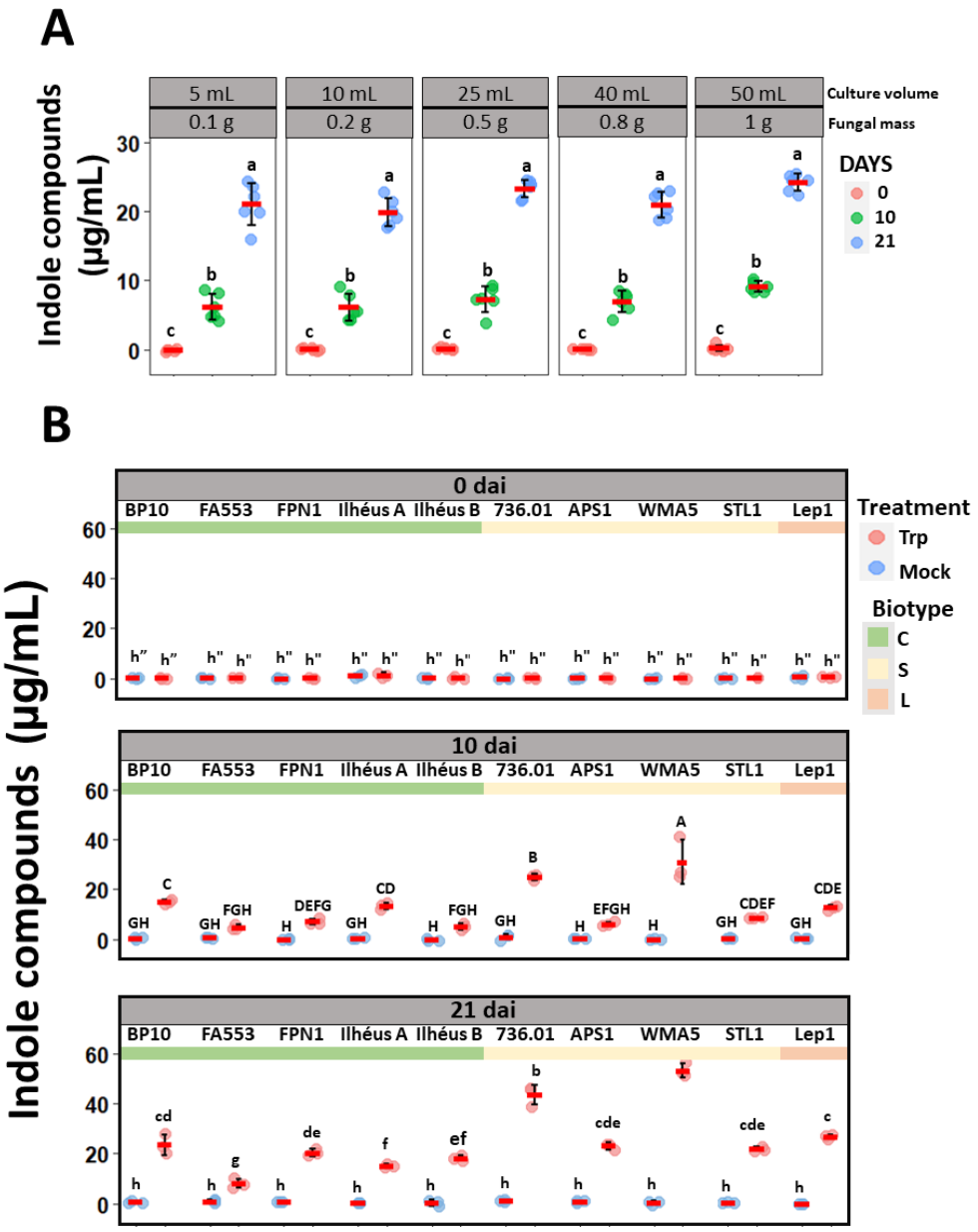

Figura 17. Isolados dos biótipos C, S e L de *M. perniciosa* produzem compostos indólicos quando suplementado com triptofano. (A) Quantificação de compostos indólicos do isolado FPN1 cultivado em diferentes volumes. A produção de compostos indólicos manteve-se constante em diferentes volumes de cultivo contendo a mesma concentração de Trp (5 mM). A quantidade de micélio em cada cultura foi ajustada de forma proporcional ao volume da cultura. As linhas vermelhas representam a média de seis réplicas biológicas. O teste ANOVA unidirecional seguido por uma análise post hoc de Tukey foi realizado. Tratamentos com a mesma letra acima do gráfico são estatisticamente indistinguíveis em um grau de confiança de 95%. (B) Quantificação de compostos indólicos dos isolados dos biótipos C, S e L em meio *Malt light* cultivado por 21 dias. Neste experimento, três condições foram avaliadas: (I) Meio de cultura (10 mL) suplementado com 5 mM de Trp e inoculado com 0.2 g de micélio do fungo, (II) Meio de cultura (10 mL) não suplementado e inoculado com 0.2 g de fungo, (III) Meio de cultura suplementado com 5 mM de Trp mas não inoculado com o fungo. As medições foram realizadas no início do experimento (dia 0) e após 10 e 21 dias de cultivo. As linhas vermelhas representam a média de três réplicas biológicas. O teste ANOVA unidirecional seguido por uma análise post hoc de Tukey foi realizado os isolados nos respectivos dias (0, 10, 21). Tratamentos com a mesma letra acima do gráfico são estatisticamente indistinguíveis em um grau de confiança de 95%.

3.3.6 O sobrenadante de culturas de *M. perniciosa* ativa a resposta à auxina em *A. thaliana*

Plântulas de *Arabidopsis* carregando o repórter DR5::*GFP* foram tratadas com o sobrenadante da cultura do fungo para confirmarmos a presença de auxina biologicamente ativa nestas culturas. A incubação das plantas em *Malt light* não ativou o promotor DR5. Ainda, a adição de 100 nM de IAA exógeno resultou em forte fluorescência, mostrando que as plantas respondem ao hormônio quando incubadas em meio de cultura *Malt light*. Enquanto o meio de cultura suplementado com Trp (sem adição de fungo) não induziu a resposta da planta, a presença do fungo levou a uma forte ativação do repórter DR5::*GFP*, tanto nas folhas quanto nas raízes (Figura 18). Essa resposta ocorreu com culturas do fungo tanto de 10 dias quanto de 21 dias, consistente com a presença de compostos indólicos em ambos os tempos (Figura 16). Nenhuma ativação da resposta da planta foi observada em culturas incubadas com *M. perniciosa* sem adição de Trp, demonstrando a importância deste aminoácido na produção de auxina por *M. perniciosa*.

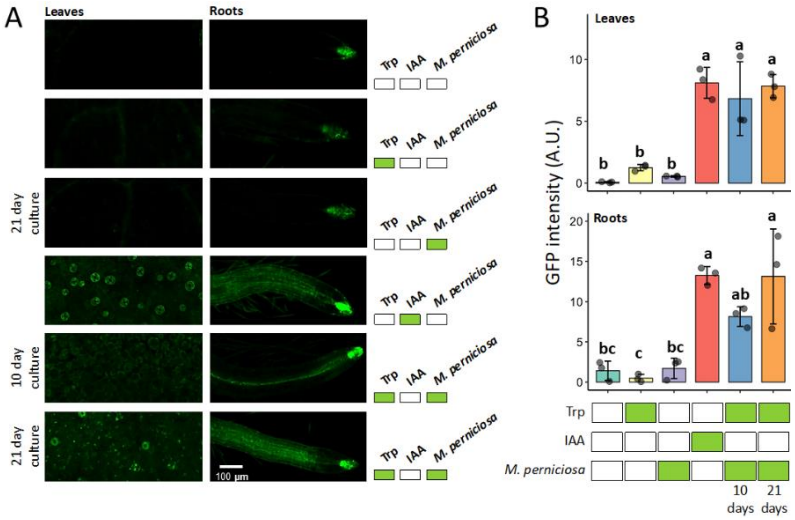

Figura 18. O sobrenadante da cultura do fungo *M. perniciosa* induz a resposta de auxina em *A. thaliana* DR5*::GFP.* (A) A ativação do repórter DR5::*GFP* em folhas e raízes de *Arabidopsis* é detectada apenas quando as plantas são expostas ao sobrenadante do fungo crescido na presença de Trp. O meio de cultura *Malt light* acrescido de 100 nM de IAA imediatamente antes do tratamento das plantas apresentou fluorescência e foi utilizado como controle positivo. Apenas o *Malt light* foi utilizado como controle negativo. Os meios contendo apenas o fungo e apenas suplementado com Trp não induziram resposta. (B) Quantificação da intensidade da fluorescência em imagens dos diferentes tratamentos. As barras de erro representam o desvio padrão calculado com base na análise de três imagens diferentes por condição. O teste ANOVA unidirecional seguido por uma análise post hoc de Tukey foi realizado. Tratamentos com a mesma letra acima do gráfico são estatisticamente indistinguíveis em um grau de confiança de 95%. Nota-se que a fluorescência dos tratamentos com fungo suplementado com Trp por 10 e 21 são similares ao controle positivo.

3.3.7 Detecção de IAA e seus intermediários por cromatografia líquida de alta eficiência

Com o objetivo de confirmar e expandir os resultados descritos acima, utilizamos cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para detectar IAA e seus possíveis intermediários na cultura do fungo suplementado com triptofano. Inicialmente, realizamos a validação do método de análise e a construção de curvas padrão de cada intermediário (Figura 19). Como resultado, fomos capazes de detectar e diferenciar as moléculas IAA, Trp e os intermediários TAM, IAM e IAN.

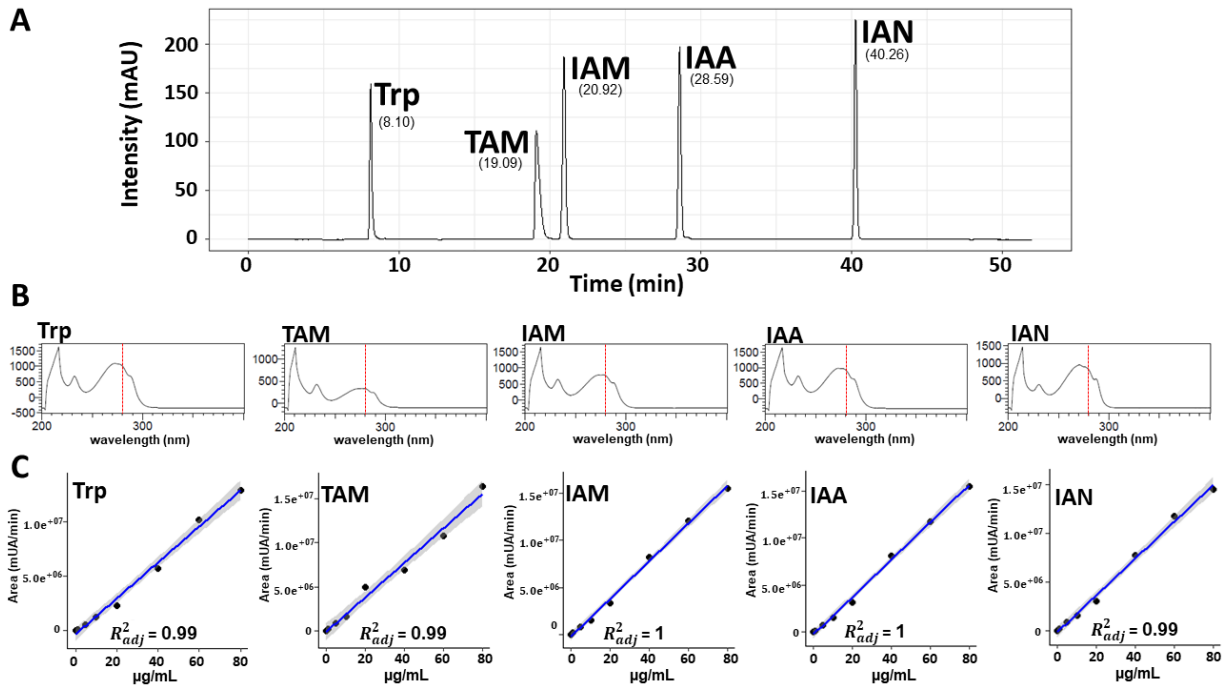

Figura 19. Detecção de IAA, Trp e os intermediários IAM, TAM e IAN por HPLC. (A) Uma mistura contendo padrões das diferentes moléculas de interesse (Trp, TAM, IAM, IAA, IAN) foi analisada por HPLC. A imagem ilustra o tempo de retenção de cada molécula (min) em relação à intensidade (mAU) dos picos. Injeção de 50 µL a uma concentração de 20 µg/ml em 10% de etanol. Nota-se o tempo de retenção diferente entre as moléculas. (B) Espectros de absorção de cada molécula. A linha vermelha indica o comprimento de onda (280 nM) no qual as leituras de absorbância foram realizadas. (C) Regressão linear das diferentes concentrações (µg/mL) das respectivas moléculas em função da área do pico obtida por HPLC. A curva padrão contém oito pontos (0,1, 5, 10, 2, 40, 60 e 80 µg/mL). A linha azul representa a regressão linear e o sombreado representa o desvio da regressão. Os pontos pretos representam a área do pico em cada concentração (µg/mL). Nota-se uma linearidade e um R^2 alto.

Com base no tempo de retenção e nos respectivos espectros dos padrões (Figura 20A), foi possível identificar a presença de IAA e possivelmente da molécula IAM no sobrenadantes de culturas de *M. perniciosa* suplementado com Trp após 21

dias de tratamento (Figura 20B). Como esperado, a cultura do fungo não suplementado com Trp não apresentou tais moléculas (Figura 20C). Ainda, a análise do meio de cultura *Malt light* puro também não revelou nenhum pico relevante (Figura 20D).

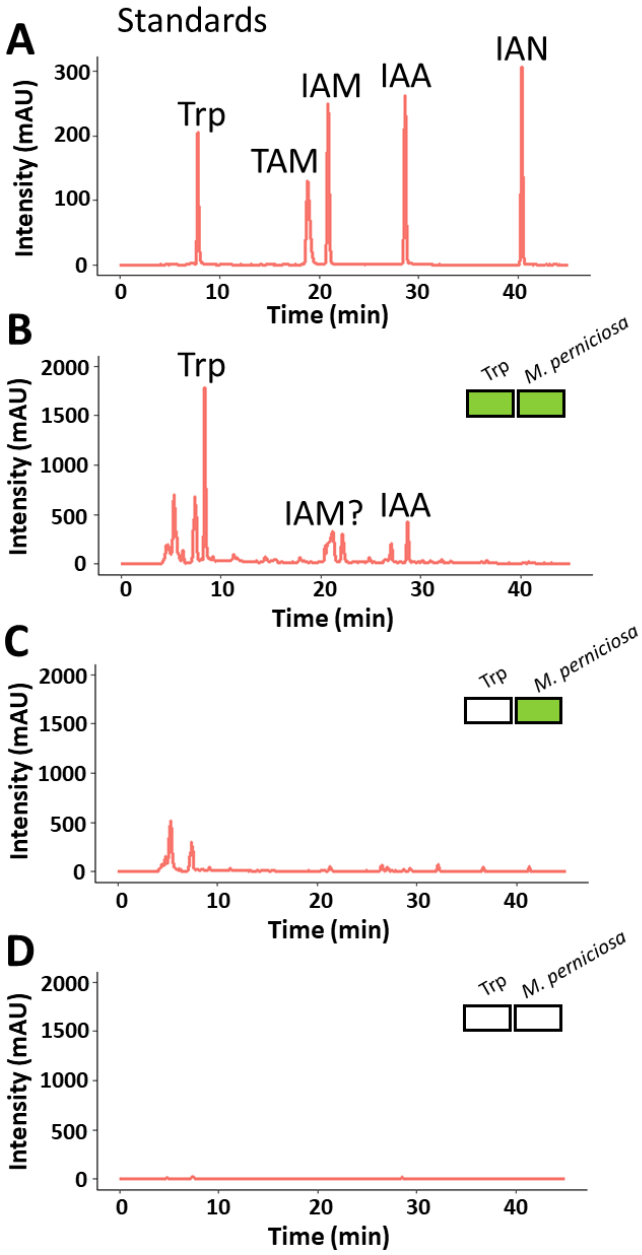

Figura 20. Detecção de IAA e possivelmente IAM em culturas do fungo *M. perniciosa*. (A) Padrões das diferentes moléculas de interesse (Trp, TAM, IAM, IAA, IAN). A imagem ilustra o tempo de retenção de cada molécula (min) em relação à intensidade (mAU) dos picos. Injeção de 50 µL a uma concentração de 20 µg/ml em 10% de etanol. (B) Extrato do meio *Malt Light* inoculado com *M. perniciosa* na presença de 5 mM de Trp. Nota-se a presença de picos compatíveis com o tempo de retenção do precursor Trp e de IAM e IAA. (C) Extrato do meio *Malt Light* inoculado com *M. perniciosa*, mas sem suplementação de Trp. (D) Extrato do meio *Malt Light* puro (i.e., não inoculado com o fungo *M. perniciosa* e sem suplementação de Trp).

A fim de confirmar a presença de IAA e IAM no extrato do fungo suplementado com Trp, adicionamos 20 µg/mL de IAA ou IAM exógenos à amostra e avaliamos a mistura por HPLC. Em concordância com nossa expectativa, tempo de retenção de IAA exógeno coincidiu com o tempo de um dos picos do extrato da cultura do fungo (Figura 21A). Ainda, o pico de IAM exógeno coincidiu com um dos picos do extrato do fungo (Figura 21B). Assim, nossos resultados confirmam que *M. perniciosa* produz IAA a partir de Trp e indicam que o IAM é um intermediário da biossíntese de auxina neste fungo. As análises do sobrenadante do fungo cultivado por 10 dias ainda não foram realizadas.

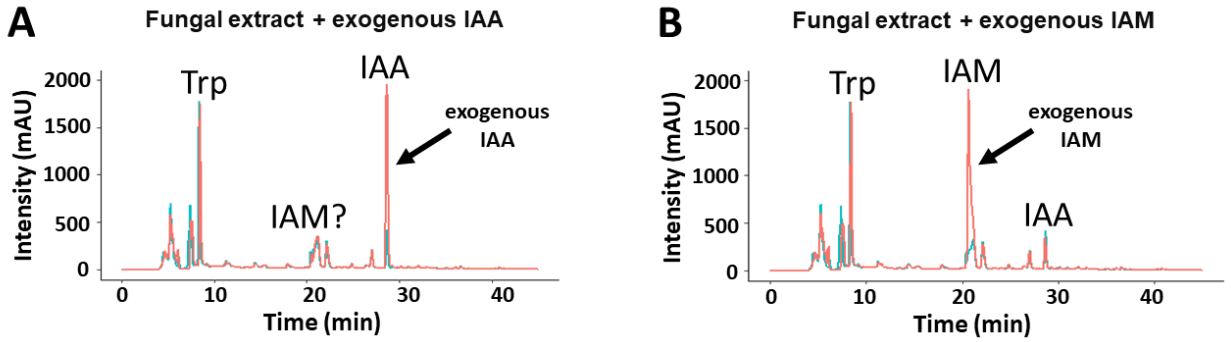

Figura 21. Contaminação do extrato da cultura de *M. perniciosa* com IAA e IAM exógenos (A) Sobreposição do extrato do meio *Malt Light* inoculado com *M. perniciosa* na presença de Trp após 21 dias de tratamento (linha azul) e da mesma amostra contaminada com 20 µg/mL de IAA (linha rosa). Injeção de 50 µL do extrato em 10 % de etanol. Nota-se a perfeita sobreposição do IAA observado no extrato e do IAA adicionado antes da injeção. (B) Sobreposição do extrato do meio *Malt Light* inoculado com *M. perniciosa* na presença de Trp após 21 dias de tratamento (linha azul) e da mesma amostra contaminada com 20 µg/ml de IAM (linha rosa). Injeção de 50 µL do extrato em 10% de etanol. Nota-se a sobreposição do IAM observado no extrato e do IAM adicionado antes da injeção.

3.4 Discussão

A vassoura de bruxa, causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, é uma importante doença nas Américas e está entre as principais razões pelo declínio da produção de amêndoas de cacau em diversos países do continente (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005; PLOETZ, 2007; PURDY; SCHMIDT, 1996). A presença de sintomas como hiperplasia, hipertrofia e perda da dominância apical, sugere a ocorrência de um desequilíbrio hormonal na fase inicial da doença (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005; PURDY; SCHMIDT, 1996; TEIXEIRA et al., 2014). Especificamente, diversas evidências indicam a participação do hormônio auxina no desenvolvimento da doença. Segundo Teixeira e colaboradores (2014), as vias de biossíntese de auxina do

cacaueiro não são induzidas durante a infecção, apesar de genes responsivos a este hormônio (*GH3*, *SAUR*, *Aux/IAA*) terem a transcrição fortemente aumentada. De fato, nosso trabalho apoia e expande esses resultados ao analisar três momentos ao longo do desenvolvimento da vassoura verde (20, 30 e 45 dai), demonstrando que genes de resposta a auxina estão induzidos durante todo o *time course* do experimento (Figura 14), diferentemente dos genes de biossíntese (Figura 15; Figura suplementar 1; Figura suplementar 2). Desta forma, é possível que a indução de genes responsivos a auxina da planta seja consequência da presença de IAA produzida pelo fungo. De fato, nossos resultados evidenciaram a presença de IAA biologicamente ativa no sobrenadante do fungo suplementado com Trp (Figura 16, Figura 18 e Figura 20).

A produção de compostos indólicos por isolados pertencentes aos três biótipos de *M. perniciosa* (Figura 17) sugere um papel evolutivamente conservado para a auxina nesta espécie. Curiosamente, mesmo o isolado pertencente ao biótipo-L, que aparentemente não induz sintomas característicos da vassoura de bruxa em seu hospedeiro, foi capaz de produzir compostos indólicos a partir de triptofano em condições *in vitro*. Esta observação poderia indicar que a auxina derivada do patógeno não é suficiente para causar alterações morfológicas no hospedeiro, ao menos pelo biótipo-L. Entretanto, a produção *in planta* de IAA por *M. perniciosa* durante a infecção de diferentes hospedeiros ainda precisa ser confirmada.

A produção de auxina é frequentemente apontada como uma estratégia de virulência em fitopatógenos (FU; WANG, 2011; WANG et al., 2007). Apesar das evidências existentes em bactérias (FU et al., 2011; SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011), um papel para a auxina como fator de virulência não foi comprovado para nenhum patógeno filamentoso até o momento. Ainda assim, a produção de IAA já foi demonstrada em múltiplos fungos com origem evolutiva independente (MAOR et al., 2004; TANAKA et al., 2011; TSAVKELOVA et al., 2012; YIN et al., 2014), sugerindo que a manipulação do metabolismo de auxina do hospedeiro seja uma estratégia de patogenicidade convergente de diferentes microrganismos. Em geral, especula-se que a perturbação do metabolismo de auxina possa favorecer patógenos por (1) promover o afrouxamento da parede celular, o que auxiliaria o crescimento e invasão do microrganismo, (2) promover o crescimento do tecido vegetal, o que contribuiria para o

aumento da disponibilidade de nutrientes no sítio de infecção, e (3) suprimir o sistema imune vegetal, uma vez que a auxina antagoniza respostas mediadas por ácido salicílico. Neste sentido, hipotetizamos que a ativação das respostas à auxina em plantas infectadas por *M. perniciosa* possa explicar os sintomas típicos da doença (i.e., crescimento exagerado). Ainda assim, é possível que a auxina potencialmente produzida por *M. perniciosa* durante a infecção possa não estar diretamente relacionada com a promoção de sintomas, assim como demonstrado para os tumores causados pelo fungo *Ustilago maydis* em milho (REINEKE et al., 2008). Ainda, a produção de IAA por *M. perniciosa* poderia explicar, ao menos em partes, a incapacidade do hospedeiro em montar uma resposta de defesa efetiva. Assim, é essencial que as hipóteses levantadas neste trabalho sejam confirmadas com experimentos envolvendo a infecção de plantas com mutantes de *M. perniciosa* incapazes de produzir IAA.

A identificação de genes de *M. perniciosa* potencialmente envolvidos na biossíntese de auxina (Figura 15) corrobora as análises já descritas por Mondego et al (2008). Ao contrário deste trabalho anterior, o qual foi baseado em um *draft* do genoma do fungo, nossas análises utilizaram uma montagem bem mais completa e que contém mais de 99% dos genes altamente conservados em basidiomicetos (dados não publicados). Assim, identificamos genes que anteriormente não haviam sido propostos como candidatos a integrarem vias de biossíntese de IAA. Nossas buscas foram realizadas de forma pouco estringente de forma a evitar a exclusão de falsos negativos em esforços subsequentes que visem a definição experimental da via de biossíntese deste hormônio em *M. perniciosa*. Em particular, empregaremos HPLC e espectrometria de massas para detectar a presença de moléculas intermediárias. De fato, além da presença da IAA, nossos primeiros experimentos utilizando HPLC revelaram a presença de IAM (ácido indol-3-acetamida), um possível intermediário da biossíntese de IAA em microrganismos (Figura 20; Figura 21). Ao menos 15 genes codificam potenciais hidrolases/amidases capazes de converter IAM em IAA (Figura 15) e, portanto, poderiam estar envolvidos na biossíntese de auxina por *M. perniciosa*. Experimentos subsequentes envolvendo análises do transcriptoma do fungo cultivado na presença de triptofano poderão auxiliar na definição de genes necessários para a biossíntese de IAA

por este patógeno. Assim, esperamos que estes esforços expandam nosso entendimento sobre as estratégias de virulência de *M. perniciosa* contribuindo, ainda, para o entendimento do papel da auxina em interações planta-patógeno de forma mais ampla.

3.5 Conclusão e Perspectivas

Genes marcadores da resposta à auxina são fortemente induzidos no cacaueiro durante a fase inicial da vassoura de bruxa. Curiosamente, genes candidatos a integrarem rotas de biossíntese deste hormônio não são ativados nas mesmas plantas. Isto sugere que o aumento da resposta à auxina em plantas infectadas seja causado diretamente pelo patógeno. De fato, nossos resultados demonstraram o acúmulo de auxina biologicamente ativa no sobrenadante do fungo cultivado na presença de triptofano, o precursor do ácido indol-3-acético. Isto demonstra o potencial de *M. perniciosa* em produzir auxina, ainda que *in vitro*.

Em conjunto, nossos resultados suportam a hipótese de que a auxina é, de fato, um fator envolvido no estabelecimento da doença vassoura de bruxa, provendo bases para a investigação de mecanismos moleculares que determinam a patogenicidade de *M. perniciosa*. Perguntas que serão abordadas em futuras pesquisas do nosso grupo incluem: Qual a rota metabólica utilizada na síntese de IAA em *M. perniciosa*? A auxina produzida por *M. perniciosa* é necessária para o desenvolvimento dos sintomas da vassoura de bruxa? O fungo *M. perniciosa* é capaz de suprimir respostas de defesa do hospedeiro através da produção de IAA? Portanto, análises futuras utilizando HPLC e espectrometria de massas serão importantes para confirmar, através da identificação de moléculas intermediárias, se o IAM é, de fato, um intermediário na rota de biossíntese de IAA neste patógeno. Ainda, buscaremos identificar outros potenciais intermediários. Assim, esperamos definir genes alvos para a obtenção de mutantes incapazes de produzir IAA. Com isso, poderemos então descrever a relação da auxina produzida pelo patógeno e os sintomas observados na vassoura de bruxa.

Referências

AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v. 97, n. 5, p. 1012–1022, out. 2005.

ANDREWS, S. **FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data**. Disponível em: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Acesso em: 4 nov. 2021.

AZEVEDO, H.; LINO-NETO, T.; TAVARES, R. M. An improved method for high-quality RNA isolation from needles of adult maritime pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 21, n. 4, p. 333–338, 1 dez. 2003.

BAUM, D. A. et al. Phylogenetic relationships of Malvatheca (Bombacoideae and Malvoideae; Malvaceae sensu lato) as inferred from plastid DNA sequences. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 11, p. 1863–1871, nov. 2004.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 1 ago. 2014.

CAO, X. et al. The roles of auxin biosynthesis YUCCA gene family in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, p. 6343, 16 dez. 2019.

CHEN, X. et al. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4510–4513, out. 2000.

CHEN, Z. et al. *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 50, p. 20131–20136, 11 dez. 2007.

DI, D.-W. et al. The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA? **Plant Growth Regulation**, v. 78, n. 3, p. 275–285, 1 abr. 2016.

EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, n. 3, p. 515–523, 1 jun. 1980.

FRIAS, G. A.; PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. An inoculation method for evaluating resistance of cacao to *Crinipellis perniciosa*. **Plant disease (USA)**, 1995.

FRIML, J. et al. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis*. **Nature**, v. 426, n. 6963, p. 147–153, nov. 2003.

FU, J. et al. Manipulating broad-spectrum disease resistance by suppressing pathogen-induced auxin accumulation in rice. **Plant Physiology**, v. 155, n. 1, p. 589–602, jan. 2011.

FU, J.; WANG, S. Insights into Auxin Signaling in Plant–Pathogen Interactions. **Frontiers in plant science**, v. 2, p. 74, 1 nov. 2011.

GANG, S. et al. Analysis of indole-3-acetic acid (IAA) production in *Klebsiellaby* LC-MS/MS and the Salkowski Method. **Bio-protocol**, v. 9, n. 9, p. e3230, 5 maio 2019.

GU, Z.; EILS, R.; SCHLESNER, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics**, v. 32, n. 18, p. 2847–2849, 15 set. 2016.

KAZAN, K.; LYONS, R. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. **The Plant Cell**, v. 26, n. 6, p. 2285–2309, jun. 2014.

KIM, D.; LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. **Nature Methods**, v. 12, n. 4, p. 357–360, abr. 2015.

LIAO, Y.; SMYTH, G. K.; SHI, W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 10, p. e108, 1 maio 2013.

MAOR, R. et al. In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1852–1854, 1 mar. 2004.

MARELLI, J.-P. et al. Infection biology of *Moniliophthora perniciosa* on *Theobroma cacao* and alternate Solanaceous hosts. **Tropical Plant Biology**, v. 2, n. 3, p. 149–160, 1 dez. 2009.

MCCARTHY, D. J.; CHEN, Y.; SMYTH, G. K. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 10, p. 4288–4297, maio 2012.

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

MELNICK, R. L. et al. The interaction of *Theobroma cacao* and *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease, during parthenocarpy. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, n. 6, p. 1261–1279, 1 dez. 2012.

MENDIBURU, F.; YASEEN, M. agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research.R package version 1.4.0. 2020.

MONDEGO, J. M. et al. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into witches' broom disease of cacao. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 548, 18 nov. 2008.

MOUBAYIDIN, L.; DI MAMBRO, R.; SABATINI, S. Cytokinin–auxin crosstalk. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 10, p. 557–562, 1 out. 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

MUTKA, A. M. et al. Auxin promotes susceptibility to *Pseudomonas syringae* via a mechanism independent of suppression of salicylic acid-mediated defenses. **The Plant Journal**, v. 74, n. 5, p. 746–754, 2013.

NUMPONSAK, T. et al. Biosynthetic pathway and optimal conditions for the production of indole-3-acetic acid by an endophytic fungus, *Colletotrichum fructicola* CMU-A109. **PloS One**, v. 13, n. 10, p. e0205070, 2018.

PLOETZ, R. C. Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1634–1639, dez. 2007.

PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 573–594, 1996.
RASBAND, W. S. **ImageJ**. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/>. Acesso em: 7 nov. 2021.

RASBAND, W. S. **ImageJ**. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/>. Acesso em: 7 nov. 2021.

REINEKE, G. et al. Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 3, p. 339–355, maio 2008.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 1 jan. 2010.

ROBINSON, M. D.; OSHLACK, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. **Genome Biology**, v. 11, n. 3, p. R25, 2 mar. 2010.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 4, p. a001438, 1 abr. 2011.

TANAKA, E. et al. Auxin production by the rice blast fungus and its localization in host tissue. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 7–8, p. 522–530, 2011

TEIXEIRA, P. J. P. L. et al. High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **The Plant Cell**, v. 26, n. 11, p. 4245–4269, nov. 2014.

TSAVKELOVA, E. et al. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium species*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 1, p. 48–57, 1 jan. 2012.

TSAVKELOVA, E. A. et al. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 117–126, 1 mar. 2006.

WANG, D. et al. Salicylic acid anhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. **Current Biology**, v. 17, n. 20, p. 1784–1790, 23 out. 2007.

WANG, H. et al. Research progresses on GH3s, one family of primary auxin-responsive genes. **Plant Growth Regulation**, v. 56, n. 3, p. 225–232, 1 dez. 2008.

YIN, C. et al. Characterization of a tryptophan 2-monooxygenase gene from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* involved in auxin biosynthesis and rust pathogenicity. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 27, n. 3, p. 227–235, mar. 2014.

YU, G. et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. **Omics: A Journal of Integrative Biology**, v. 16, n. 5, p. 284–287, maio 2012.

Material Suplementar

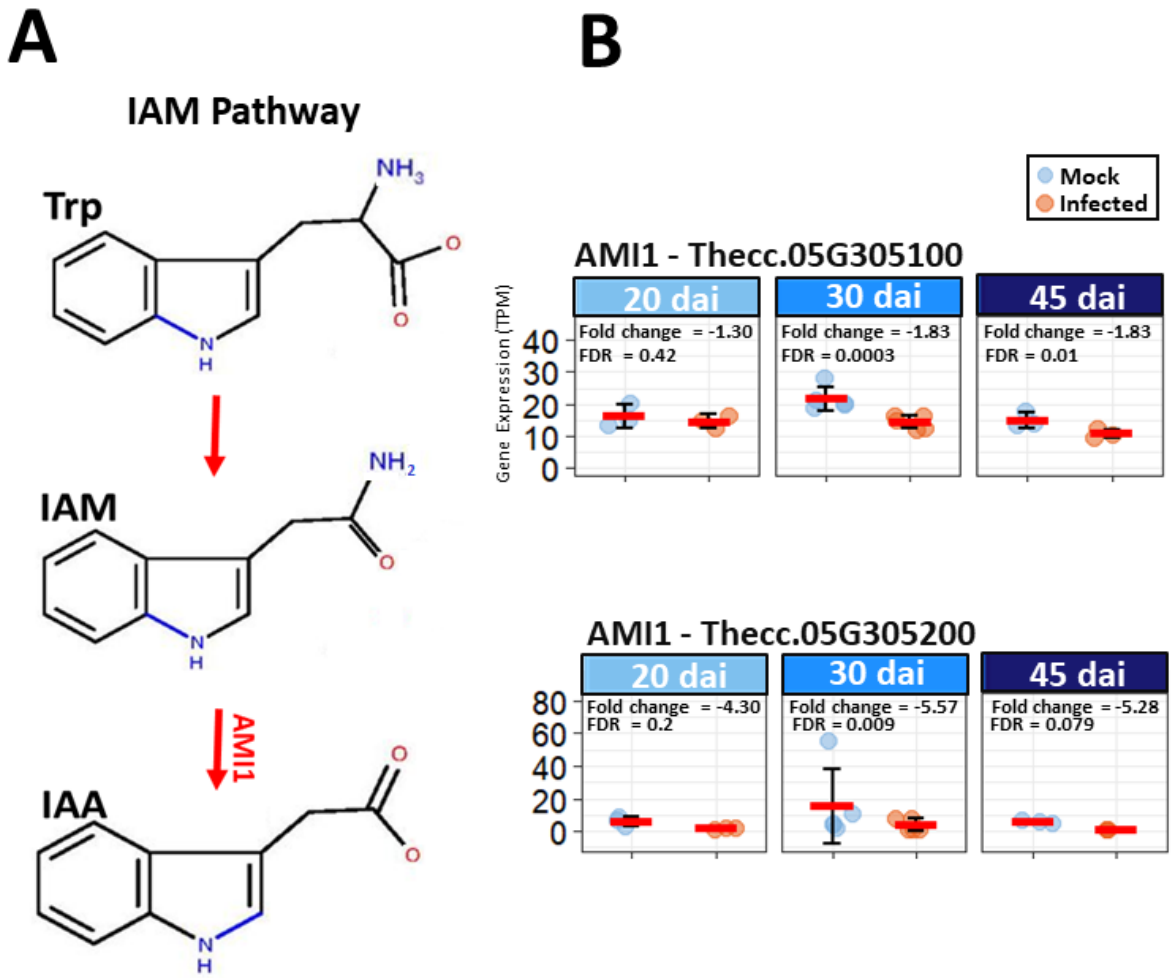

Figura suplementar 1. A via de biossíntese IAM não é induzida em cacaueiro infectado com a vassoura de bruxa. (A) A via do IAM é composta por duas enzimas e envolve a conversão de triptofano (Trp) em ácido indol-3-acetamida (IAM) e, então, em ácido indol-3-acético (IAA). (B) Genes do cacaueiro expressos em nosso experimento e potencialmente pertencentes a essa rota são apresentados. A via IAM possui apenas dois genes candidatos expressos em nosso experimento, sendo o AMI1 diferencialmente expresso e regulado negativamente em 30 dai. Isto sugere que essa via, assim como as demais, não é ativada transcricionalmente durante o estágio biotrófico da doença.

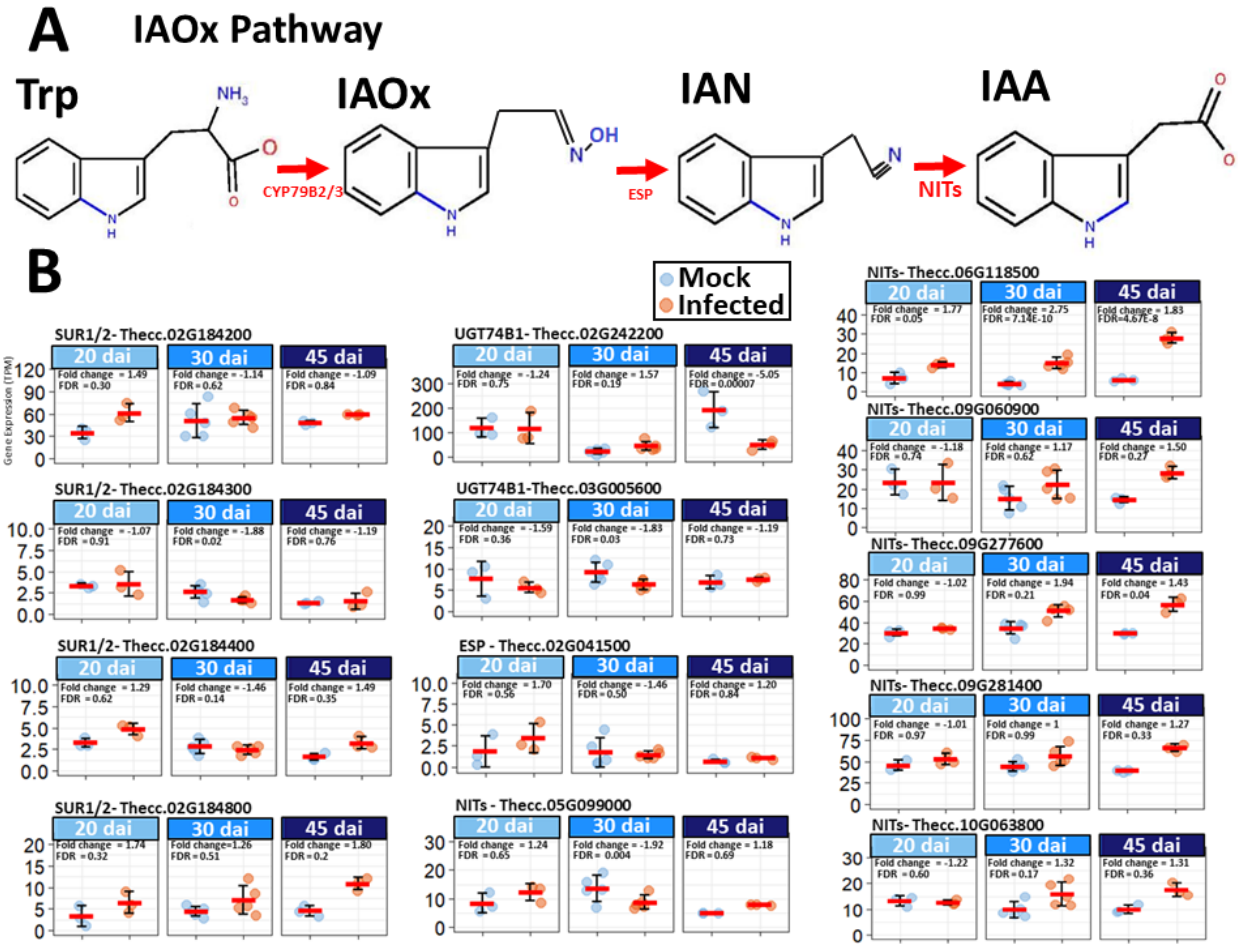

Figura suplementar 2. A via de biossíntese IAOx não é induzida em cacaueiro infectado com a vassoura de bruxa. (A) A via do IAOx é composta por três enzimas e envolve a conversão de triptofano (Trp) em indol-3-acetaldoxima (IAOx), conversão de IAOx em ácido indol-3-acetonitrila (IAN) e, então, em ácido indol-3-acético (IAA). (B) Genes do cacaueiro expressos em nosso experimento e potencialmente pertencentes a essa rota são apresentados. Dentre eles, treze genes candidatos expressos, sendo dois genes diferencialmente expressos. O gene UGT7481 - Thecc.02G242200 está regulado negativamente em 45 dai, enquanto o outro, que codifica uma provável nitrilase (NITs – Thecc.06G118500), esta regulado positivamente em 30 e 45 dai. Isto sugere que essa via, assim como as demais, não é ativada transcricionalmente durante o estágio biotrófico da doença.

4 MANIPULAÇÃO GENÉTICA DO FUNGO *Moniliophthora perniciosa*

Resumo

O fungo *Moniliophthora perniciosa* é o agente causador da vassoura de bruxa do cacaueiro, a principal doença que afeta esta planta no Brasil. O mais importante gargalo para o estudo da vassoura de bruxa é a inexistência de um método eficiente que permita a manipulação genética e a obtenção de mutantes de *M. perniciosa*. Desde o início do Projeto Genoma Vassoura de Bruxa em 2000, múltiplos pesquisadores dedicaram esforços para a superação desta limitação e, como consequência, importantes avanços foram acumulados ao longo do tempo. Apesar de ainda pouco eficientes, métodos para a introdução de DNA exógeno no genoma de *M. perniciosa* já foram reportados, porém nenhuma linhagem mutante deste patógeno foi obtida até o momento. Nesse sentido nosso grupo vem trabalhando no desenvolvimento de um protocolo eficiente de transformação do fungo, que tem se tornado uma prática rotineira em nosso laboratório. A introdução de um constructo contendo o gene de resistência a higromicina em dois isolados do fungo *M. perniciosa* resultou em centenas de colônias transformantes, o que é suficiente para todas as análises subsequentes que pretendemos realizar. De fato, nossos resultados são promissores, visto que o procedimento foi repetido diversas vezes e por diferentes integrantes do grupo de pesquisa do LaGIP, obtendo-se sempre alta eficiência. A perspectiva para nosso grupo é utilizar a tecnologia CRISPR/Cas9 para a obtenção de mutantes de genes codificadores de potenciais fatores de patogenicidade, a exemplo do trabalho apresentado no Capítulo I. Uma vez identificados genes potencialmente responsáveis pela biossíntese de auxina, esperamos obter mutantes do fungo incapazes de produzir este hormônio. Assim, será possível infectar plântulas de cacaueiro e então avaliar o papel da auxina derivada do patógeno na virulência e no surgimento dos sintomas característicos da vassoura de bruxa.

Palavra-chave: Fungo, Transformação, Cacau, Patógeno

Abstract

The fungus *Moniliophthora perniciosa* is the causal agent of witches' broom disease, the main disease that affects the cacao tree in Brazil. The most important bottleneck for the study of witches' broom disease is the lack of efficient methods for genetic manipulation and production of *M. perniciosa* mutants. Since the beginning of the Witches' Broom Genome Project in 2000, multiple researchers have dedicated efforts to overcome this limitation and, consequently, important advances have been accumulated over time. Although still inefficient, methods for introducing exogenous DNA into the genome of *M. perniciosa* have been reported, but no mutant strain of this pathogen has been obtained so far. Thus, our group has been working on the development of an efficient protocol for the transformation of this fungus, which has become a routine practice in our laboratory. The introduction of a construct containing the hygromycin resistance gene into two isolates of the *M. perniciosa* fungus resulted in hundreds of transformed colonies, which is sufficient for all downstream analyses we plan to perform. Our results are promising, as the procedure was repeated several times and by different members of the LaGIP research group, always with high efficiency. Our

perspective is to employ the CRISPR/Cas9 technology to obtain mutants of genes encoding potential pathogenicity factors, as in the work presented in Chapter 1. Once genes potentially responsible for auxin biosynthesis have been identified, we expect to obtain mutants unable to produce this hormone. Thus, it will be possible to infect cacao seedlings and then correlate the role of fungal-derived auxin in the *M. perniciosa* virulence and in the development of witches' broom disease symptoms.

Keywords: Fungi, Transformation, Cacao, Pathogen

4.1 Introdução

A vassoura de bruxa é uma importante doença do cacaueiro na América e está entre as principais razões pelo declínio da produção de cacau em diversos países do continente. No Brasil, a introdução da doença na principal região produtora do país (sul da Bahia) em 1989, impactou de forma severa o mercado nacional de amêndoas de cacau e o país, que até então era exportador, em poucos anos se tornou importador do produto (MEINHARDT et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2015). Dada a necessidade de melhor entender o problema, um consórcio envolvendo múltiplos laboratórios do Brasil iniciou, no ano 2000, o Projeto Genoma Vassoura de Bruxa, o qual buscou sequenciar o genoma do fungo *M. perniciosa* e elucidar aspectos de sua complexa biologia. Ao longo de mais de duas décadas de pesquisas, uma série de potenciais fatores de virulência deste fungo foram identificados e estudados de forma detalhada, incluindo proteínas PR-1 (*Pathogenesis-Related 1*) (TEIXEIRA et al., 2012), ceratoplataninas (DE O. BARSOTTINI et al., 2013), proteínas causadoras de necrose da família NEP (*Necrosis and Ethylene-Inducing Proteins*) (GARCIA et al., 2007), uma oxidase alternativa (AOX) (THOMAZELLA et al., 2012) e uma quitinase cataliticamente inativa capaz se suprimir respostas de defesas de plantas (FIORIN et al., 2018). Além disso, uma série de genes codificantes de efetores candidatos (CSEPs – *Candidate Secreted Effector Proteins*) foram identificados com base em análises de genomas e transcriptomas (TEIXEIRA et al., 2014). Apesar dos avanços, a compreensão dos papéis funcionais dessas proteínas ainda é bastante limitada pela ausência de métodos para a obtenção de linhagens mutantes de *M. perniciosa*.

Considerado um modelo bastante difícil de se trabalhar, o fungo *M. perniciosa* é recalcitrante à transformação e a inexistência de métodos de manipulação genética tem constituído um dos principais gargalos para o estudo molecular da vassoura de bruxa

desde o início do Projeto Genoma. Assim, múltiplos pesquisadores dedicaram esforços para superar esta limitação e importantes avanços foram acumulados de forma gradual ao longo de vários anos de pesquisa. O primeiro passo para a obtenção de um protocolo de transformação foi realizado por Lima e colaboradores (2003), que reportaram a obtenção bem-sucedida de linhagens transformantes do fungo (linhagens nas quais o gene de resistência à higromicina foi introduzido) através do tratamento de protoplastos na presença de polietilenoglicol e cloreto de cálcio (PEG/$CaCl_2$). Neste sistema, cerca de 2 transformantes foram obtidos por micrograma de DNA. Porém, aproximadamente 54% dos transformantes foram abortivos (i.e., não se desenvolveram por um período prolongado em meio de cultura), sendo o restante estáveis e com diferentes níveis de resistência à higromicina B. Posteriormente, Lopes e colaboradores (2008) demonstraram um aumento da eficiência de obtenção de transformantes do fungo utilizando enzimas de restrição durante o procedimento de transformação (REMI – *Restriction Enzyme Mediated Integration*). A obtenção de 4 a 24 transformantes por micrograma de DNA foi reportada neste trabalho. Em conjunto, esses trabalhos forneceram metodologias úteis para a introdução de DNA exógeno nas células de *M. perniciosa*, provendo bases para o estabelecimento de ferramentas de manipulação genética deste fitopatógeno. Posteriormente, Caribé e colaboradores (2009) reportaram o silenciamento de dois genes do fungo por meio de interferência por RNA (RNAi). Entretanto, este sistema mostrou-se viável apenas para o micélio necrotrófico cultivado *in vitro*, não permitindo o estudo da função gênica em condições associadas à patogenicidade do fungo. Através da transformação de protoplastos em presença de PEG/$CaCl_2$, Barau e colaboradores (2015) foram capazes de gerar linhagens transgênicas do fungo carregando uma fusão da proteína envolvida em autofagia MpATG8 (*Autophagy-related protein 8*) e o marcador fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*). Tal estratégia permitiu a análise da localização subcelular da proteína MpATG8 em condições de *starvation* nutricional, possibilitando uma avaliação do processo de autofagia em *M. perniciosa*. Apesar de importantes, esses avanços não se traduziram em práticas rotineiras aplicáveis ao estudo da vassoura de bruxa, possivelmente devido à dificuldade que diferentes laboratórios encontraram em reproduzir os protocolos.

Mais recentemente, o então aluno de mestrado Gabriel Lorencini Fiorin, orientado pelo Prof. Gonçalo Pereira (Unicamp) e coorientado pelo Prof. Paulo Teixeira (USP), foi capaz de introduzir em *M. perniciosa* um constructo contendo o gene de resistência à higromicina, a nuclease Cas9 e o cassete codificante do RNA guia (gRNA; *guide RNA*), o qual determina a especificidade do sistema CRISPR/Cas9 (i.e., o gene alvo a ser editado). Linhagens resistentes à higromicina e carregando o gene *Cas9* foram obtidas, porém, análises subsequentes revelaram que este gene não foi transcrito nestas linhagens transgênicas, explicando a ausência de eventos de edição gênica (dados não publicados). O motivo da ausência de expressão do gene *Cas9* nestas linhagens de *M. perniciosa* ainda não foi explorado, mas pode incluir, entre outros fatores, a ineficiência do promotor utilizado para a transcrição do gene *Cas9*. Frente a isso, nosso grupo tem trabalhado no estabelecimento de procedimentos de transformação e na construção e avaliação sistemática de novos cassetes de DNA.

Neste trabalho, demonstramos a transformação eficiente e estável de *M. perniciosa* com um cassete contendo o gene de resistência à higromicina B. Isolados pertencentes a diferentes biótipos de *M. perniciosa* foram transformados com sucesso, resultando em centenas de colônias transformantes. O procedimento vem sendo aplicado de forma rotineira em nosso grupo e estabelece bases para a edição do genoma de *M. perniciosa* por CRISPR/Cas9. Assim, estes resultados são um importante avanço no estudo da vassoura de bruxa e poderão apoiar a geração inédita de mutantes de genes de interesse, como aqueles que codificam efetores de virulência putativo ou participam da biossíntese de auxina.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Material biológico

Os experimentos foram realizados com os isolados FPN1 e WMA5, pertencentes aos biótipos-C e S de *M. perniciosa*, respectivamente. A manutenção do fungo foi realizada em placas de Petri contendo meio *Malt Yeast Extract Agar* (MYEA; extrato de malte 15 g/L; extrato de levedura 5 g/L; ágar 20 g/L). O cultivo do fungo em meio líquido foi realizado inoculando-se pequenas quantidades do micélio obtido das placas de Petri

em meio *Malt light* (extrato de malte 1.7 g/L; extrato de levedura 5 g/L; 5% glicerol). Os plasmídeos foram propagados em *Escherichia coli* Top10.

4.2.2 Preparação do constructo de DNA para a transformação de *M. perniciosa*

Em nossos primeiros ensaios de transformação do fungo *M. perniciosa,* utilizamos um cassete de DNA contendo o gene de resistência à higromicina B de *Escherichia coli* (Hph - *Hygromycin-B-phosphotransferase*) sob controle do promotor do gene *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) de *Agaricus bisporus*, fusionado ao terminador 35S de CAMV (*Cauliflower mosaic virus*). Este cassete foi extraído do vetor pBGgHg, o qual foi previamente utilizado para transformar o fungo *Agaricus bisporus* (CHEN et al., 2000) e transferido para o vetor pGEM-T Easy (Promega).

Antes da transformação do fungo, o DNA foi isolado de *E. coli* utilizando-se dois protocolos distintos: (a) O método da lise alcalina padrão descrito por Sambrook et al (1989); (b) O método descrito por Birnboim & Doly, (1979). Apesar de similares, os métodos diferem no fato de que o protocolo de Sambrook e colaboradores (1989) elimina moléculas de RNA através da adição da enzima RNAse A a um dos tampões de extração. Por outro lado, o protocolo de Birnboim & Doly (1979) não envolve este tratamento, o que resulta em uma preparação plasmidial enriquecida em RNA. Acredita-se que a presença de grandes quantidades de RNA na preparação possa favorecer a precipitação e a introdução do DNA exógeno no núcleo do fungo durante o procedimento de transformação (DÖRNTE; KÜES, 2012). Após os primeiros experimentos, passamos a realizar a extração plasmidial com o método de Sambrook et al (1989) modificada para omitir a adição de RNAse A, a qual se mostrou eficiente.

4.2.3 Transformação de protoplastos do fungo *M. perniciosa*

A transformação de *M. perniciosa* foi realizada através da exposição de protoplastos ao constructo de DNA exógeno de interesse na presença de PEG e $CaCl_2$. Para a preparação dos protoplastos, o fungo foi inicialmente cultivado em meio *Malt light* líquido por 10 dias a 28ºC e agitação de 200 rpm. O equivalente a um volume de

aproximadamente 10 mL de micélio foi então transferido para um tubo de 50 mL, juntamente com 5 mL de *glass beads* (diâmetro: 3 mm) e 25 mL de meio RGM (3 g/L triptona; 7 g/L extrato de malte; 7 g/L extrato de levedura; 10 g/L glicose; 3g/L glicose; 3g/L manitol; 25mL glicerol). O tubo foi então agitado manualmente por 60 segundos de forma a quebrar o micélio em pedaços menores. Após filtração em peneira esterilizada, os fragmentos de micélio foram transferidos para meio RGM e mantidos a 28ºC e agitação de 200 rpm. Após três dias, um volume de aproximadamente 15 mL do micélio foi lavado com 25 mL de KCl a 0.8 M e então incubado em 20 mL de solução de protoplastização (20 mg/mL de Glucanex® 200G, 10 mg/mL de BSA, 0.9 M sorbitol) por duas horas a 28ºC e agitação de 90 rpm. A Glucanex® 200G (Sigma) é uma mistura de beta-glucanases, quitinases e proteases que digerem a parede celular do fungo. Em seguida, o produto do tratamento foi filtrado duas vezes com filtros de nylon de 80 µm (*Millipore*) para separar os protoplastos dos fragmentos das paredes celulares degradadas pela Glucanex® 200G. Após duas lavagens com uma solução osmoestabilizadora (0.9 M de sorbitol), os protoplastos foram ressuspendidos em 1 mL de uma solução contendo cloreto de cálcio a 50 mM e sorbitol a 0.9 M. Por fim, 200 µL da suspensão de protoplastos foram incubados com o DNA de interesse no gelo por 40 min. Após essa incubação, 1 mL da solução de transformação (40% PEG4000, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM CaC l_2, 0.9 M sorbitol) foi adicionada e a mistura foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. Os protoplastos foram então misturados a 5 mL de meio de regeneração (5 g/L peptona, 5 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de glicose, 1 g/L de manitol, 0.5% de glicerol, 15 g/L de ágar) derretido e equilibrado a 37ºC e vertidos em placa de Petri. Após três dias de incubação a 28ºC, 5 mL de *top agar* (6 g/L de extrato de malte, 2 g/L de glicose, 2 g/L de manitol, 2 mL de glicerol, 3 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 171.15 g/L de sacarose e 8 g/L de ágar) contendo 500 µg/mL de higromicina B foi aplicado a cada placa para seleção de colônias transformantes. Após 20 dias de crescimento, as colônias transformantes foram transferidas para placas de Petri tripartida contendo meio *Malt Yeast Extract Agar* e 100 µg/mL de higromicina B.

4.3 Resultados

4.3.1 Preparação de DNA para a transformação de *M. perniciosa*

O plasmídeo carregando o cassete para expressão do gene de resistência à higromicina B foi mantido e propagado em células de *E. coli*. Antes da transformação de *M. perniciosa* com este vetor, o plasmídeo foi isolado utilizando-se dois protocolos distintos: (a) O método descrito por Sambrook et al 1989 (DNA A; Figura 22); (b) O método descrito por Birnboim & Doly, 1979 (DNA B e DNA C; Figura 22). A principal diferença nestes métodos está na presença de RNA na preparação final. Enquanto o protocolo de Sambrook et al 1989 resulta em DNA plasmidial livre de RNA devido ao tratamento com RNAse A, a preparação obtida pelo protocolo de Birnboim & Doly, 1979 possui grandes quantidades de RNA por omitir o tratamento com esta enzima. Essa diferença pode ser facilmente observada após a realização de eletroforese em géis de agarose (Figura 22).

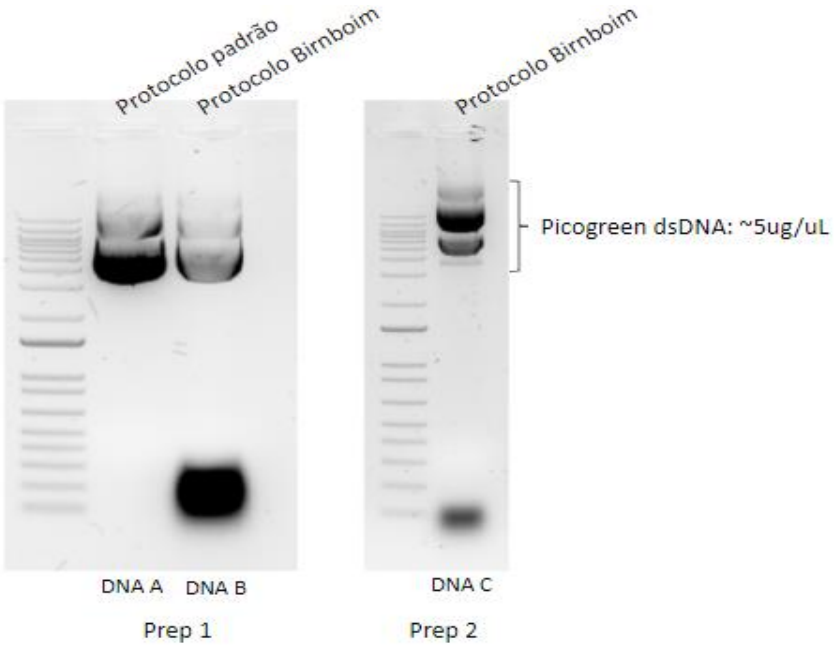

Figura 22. Preparação de DNA para transformação de *M. perniciosa*. O cassete contendo o gene de resistência à higromicina B sob controle do promotor *GAPDH* de *Agaricus bisporus* foi clonado no vetor pGEM-T Easy. Este plasmídeo foi mantido e propagado em células de *E. coli*. Antes da transformação de *M. perniciosa* com este construto, o plasmídeo foi isolado utilizando-se dois protocolos: (I) O método padrão descrito por Sambrook et al 1989 (DNA A) e (II) o método descrito por Birnboim & Doly, 1979 (DNA B e DNA C). Duas preparações independentes foram realizadas (Prep 1 e Prep 2). Nota-se a presença de RNA (degradado) apenas quando o protocolo de Birnboim & Doly, 1979 é utilizado. A quantificação do DNA foi realizada utilizando-se o reagente Picogreen dsDNA, o qual é específico para DNA dupla fita.

4.3.2 Transformação do fungo *M. perniciosa*

O micélio de *M. perniciosa* foi submetido ao procedimento de digestão da parede celular para isolamento de protoplastos (Figura 23). A quantificação das células em câmara de Neubauer revelou a obtenção de 3.3E7 (33 milhões) protoplastos por mililitro de suspensão.

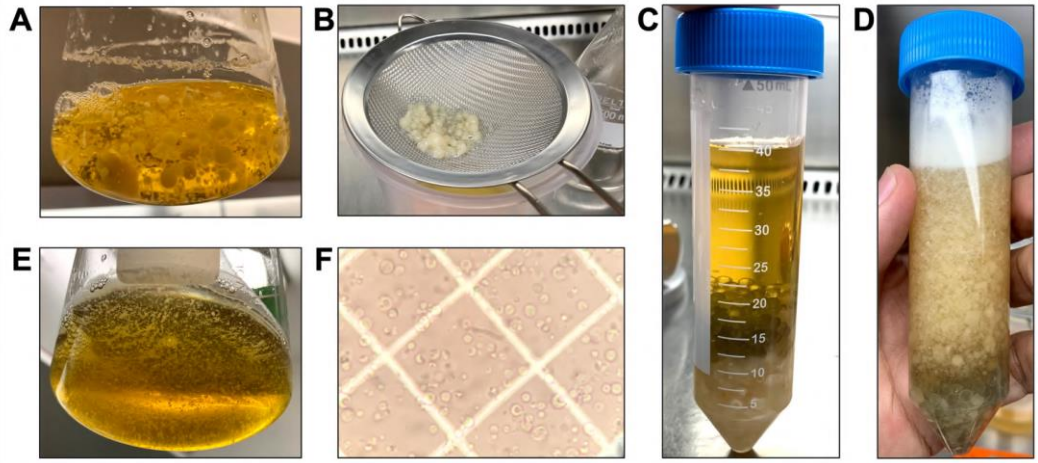

Figura 23. Isolamento de protoplastos de *M. perniciosa*. (A) Micélio do fungo *M. perniciosa* (isolado FPN1) cultivado em meio *Malt light* líquido por 10 dias. (B) Micélio coletado em uma peneira estéril. (C) O equivalente a um volume de 10 mL de micélio foi transferido para um tubo de 50 mL, juntamente com 5 mL de Glass Beads (3 mm) e 25 mL meio de cultura RGM. (D) O tubo foi agitado por 60 segundos para quebrar o micélio em fragmentos pequenos. (E) Micélio fragmentado em *Erlenmeyer* contendo 100 mL de meio RGM, o qual foi incubado a 28ºC e 200 rpm por 3 dias antes da digestão da parede celular para isolamento dos protoplastos. (F) Após a digestão do micélio do fungo com o coquetel de enzimas Glucanex (Sigma), observa-se a liberação dos protoplastos, os quais assumem morfologia de esfera na suspensão. Em média, nossas preparações resultaram em aproximadamente 33 milhões de protoplastos por mililitro de suspensão.

O plasmídeo contendo o cassete para expressão do gene de resistência à higromicina B foi então utilizado na transformação do isolado FPN1 de *M. perniciosa* (pertencente ao biótipo-C). Para isso, 200 µL da suspensão de protoplastos foram incubadas na presença de diferentes quantidades de DNA (10 µg e 50 µg) isolado segundo os dois métodos descritos acima. Notavelmente, muitas colônias resistentes à higromicina foram obtidas em todas as condições testadas (Figura 24). Porém, o uso de diferentes protocolos para isolar o DNA (com ou sem RNAse A) não resultou em diferenças claras na eficiência da transformação. Como esperado, nenhum crescimento foi observado em placas contendo protoplastos que não receberam o DNA. Após sete

dias, 40 colônias foram transferidas para meio de cultura contendo higromicina B para confirmação da resistência ao antibiótico. Todas apresentaram crescimento.

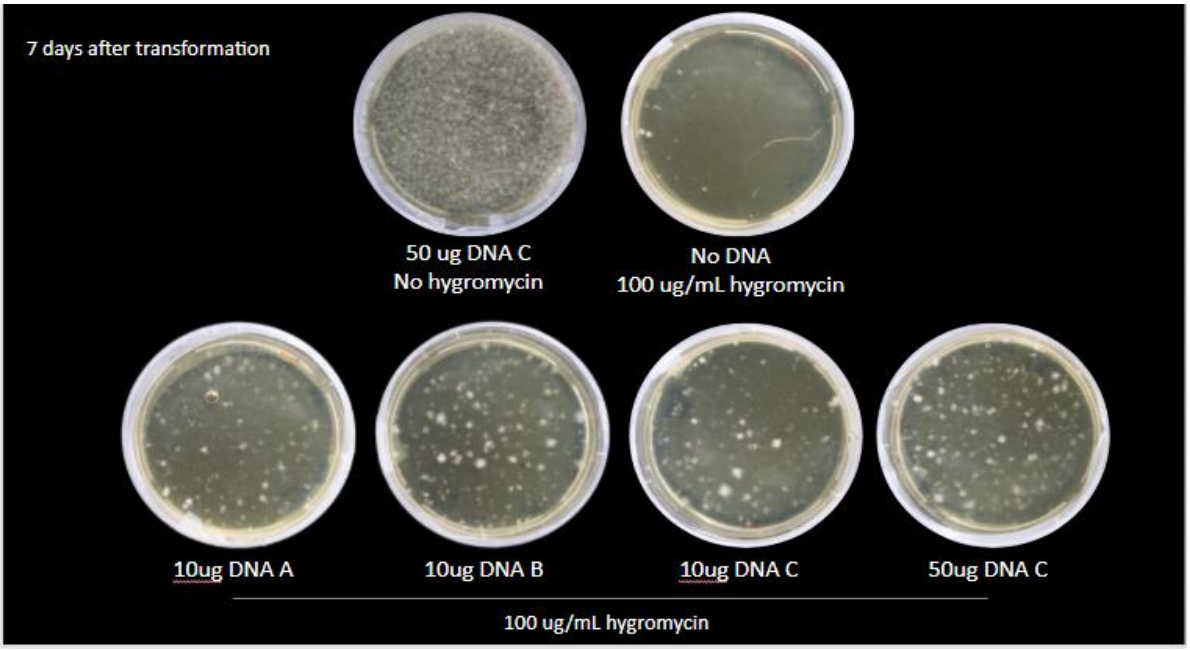

Figura 24. Transformação do isolado FPN1 do fungo *M. perniciosa*. A imagem mostra placas de Petri nas quais os protoplastos do fungo foram cultivados após o procedimento de transformação. Após sete dias, observa-se desenvolvimento do micélio na presença de higromicina B apenas nas condições que receberam DNA, demonstrando a eficiência deste antibiótico em restringir o desenvolvimento do fungo não transformado. A placa que não continha higromicina apresentou intenso crescimento de micélios, pois colônias não transformantes também se desenvolveram. O DNA utilizado (DNA A, DNA B e DNA C), foi isolado por diferentes métodos, como apresentado na figura 22. O uso de diferentes protocolos para isolar o DNA não resultou em diferenças claras na eficiência da transformação.

Uma vez que a espécie *M. perniciosa* é classificada em biótipos segundo a especificidade de hospedeiro, a capacidade de manipular geneticamente isolados pertencentes a diferentes biótipos é de grande relevância para o estudo do patógeno. Desta forma, o procedimento de transformação também foi avaliado utilizando-se o isolado WMA5, pertencente ao biótipo-S da espécie. O procedimento adotado foi o mesmo descrito para o isolado FPN1 (Figura 23). Neste experimento, a eficiência do procedimento foi estimada em aproximadamente 40 transformantes por micrograma de DNA (Figura 25).

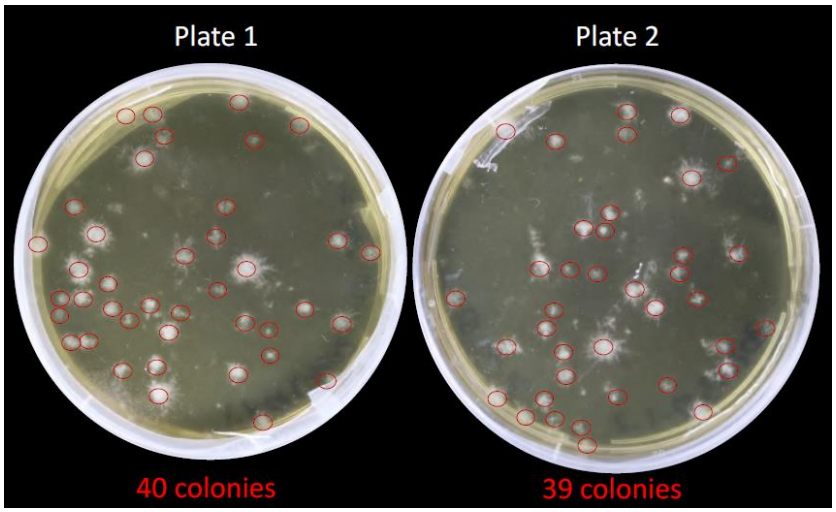

Figura 25. Contagem de colônias transformantes obtidas para o isolado WMA5 de *M. perniciosa*. Cada uma das placas apresentadas contém 100 µg/mL de higromicina B e recebeu 200 uL de protoplastos transformados com 1 µg de DNA. Círculos vermelhos identificam as colônias contadas. O plaqueamento da mesma quantidade de protoplastos em meio não seletivo (sem higromicina B) não permitiu a distinção de colônias devido ao grande crescimento miceliar (células não transformadas também se desenvolvem; não mostrado).

Subsequentemente, avaliamos a relação entre o número de transformantes obtidos e a quantidade de DNA utilizada no procedimento. No entanto, após os primeiros experimentos (Figura 24, Figura 25), passamos a utilizar DNA isolado com o método de Sambrook et al 1989, porém sem adição de RNAse (Figura 26).

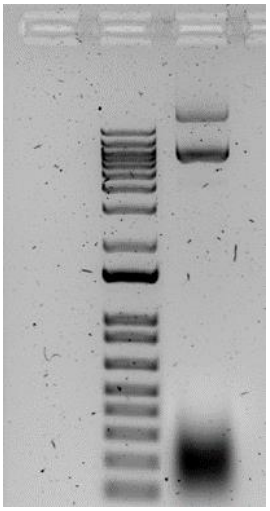

Figura 26. Preparação de DNA para transformação de *M. perniciosa*. O cassete contendo o gene de resistência à higromicina B sob controle do promotor *GAPDH* de *Agaricus bisporus* foi clonado no vetor pGEM-T Easy. Este plasmídeo foi mantido e propagado em células de *E. coli*. Antes da transformação de *M. perniciosa* com este construto, o plasmídeo foi isolado utilizando o método padrão descrito por Sambrook et al 1989, porém sem adição de RNAse A. A presença de RNA degradado é observada na parte inferior do gel. A quantificação do DNA foi realizada utilizando-se o reagente Picogreen dsDNA, o qual é específico para DNA dupla fita.

Para isso, cinco alíquotas de protoplastos do isolado FPN1 foram incubadas na presença de PEG/$CaCl_2$ com diferentes quantidades de DNA: 0 µg, 1µg, 2.5 µg, 5 µg e 10 µg. Após a incubação, os protoplastos foram plaqueados (em duplicata para cada quantidade de DNA) em meio de cultura e selecionados utilizando-se o antibiótico higromicina B. Como esperado, nenhuma colônia foi obtida quando os protoplastos não foram incubados com DNA (Figura 27A), demonstrando eficiência da higromicina B em impedir o desenvolvimento de *M. perniciosa*. Todas as demais condições (i.e., protoplastos incubados com DNA) apresentaram crescimento micelial (Figura 27A). Notavelmente, uma clara relação positiva (R^2=0.98; Figura 27B) foi observada entre a quantidade de DNA utilizada e o número de colônias resistentes ao antibiótico que se desenvolveram. Neste experimento, obtivemos aproximadamente cinco transformantes por micrograma de DNA utilizado.

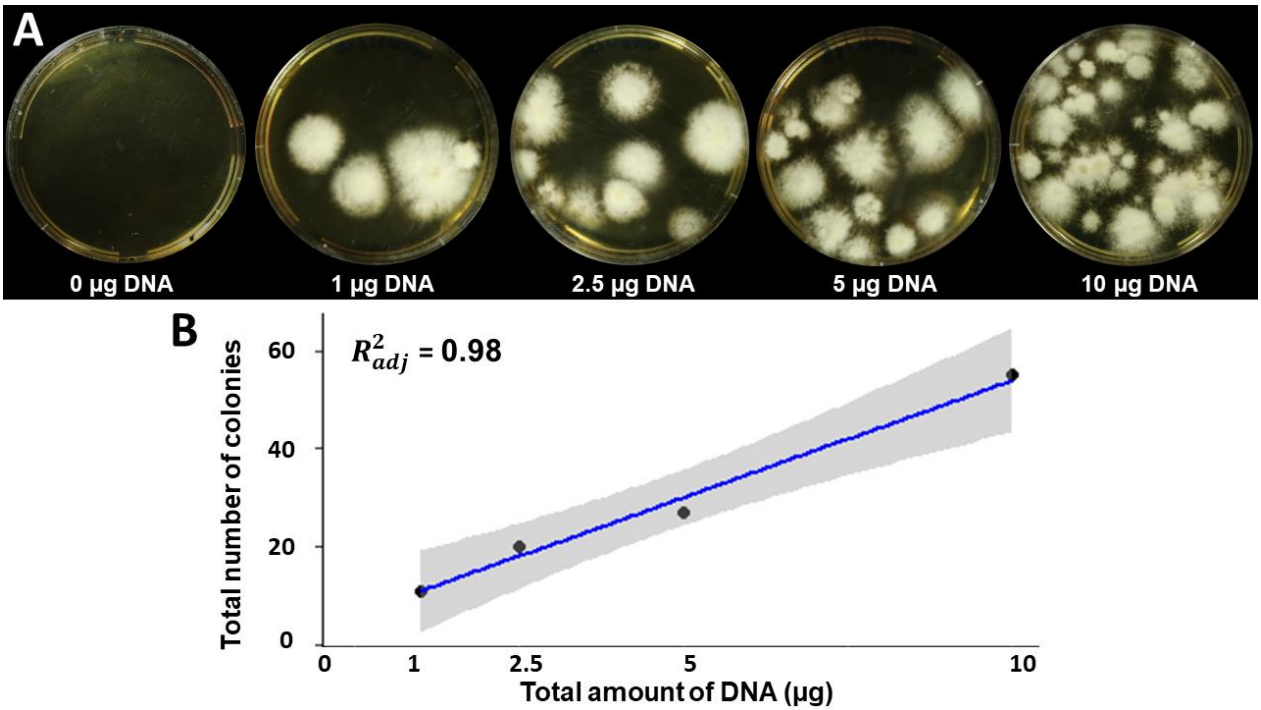

Figura 27. Relação entre a quantidade de DNA utilizada e o número de transformantes de *M. perniciosa* obtidos. (A) Protoplastos do fungo foram incubados com diferentes quantidades de DNA (cassete para expressão do gene *Hph*) na presença de PEG/$CaCl_2$ e subsequentemente selecionados em meio de cultura contendo o antibiótico higromicina B a uma concentração de 100 µg/mL. Observa-se maior número de colônias nas condições que receberam mais DNA. (B) Regressão linear mostrando a correlação entre quantidade de DNA e número de transformantes obtidos.

A fim de avaliarmos a estabilidade das transformações, aproximadamente 50 colônias resistentes à higromicina B foram selecionadas e subcultivadas em novos meios de culturas por mais três repiques (aproximadamente três meses de cultivo). Em todos os casos, as culturas continuaram a se desenvolver no antibiótico sem nenhuma alteração detectável no desenvolvimento (Figura 28). Ainda, colônias transferidas para meio de cultura sem antibiótico mantiveram a resistência quando transferidas novamente para meio seletivo (resultado não apresentado), mostrando que a integração do cassete de resistência à higromicina é estável nas condições avaliadas.

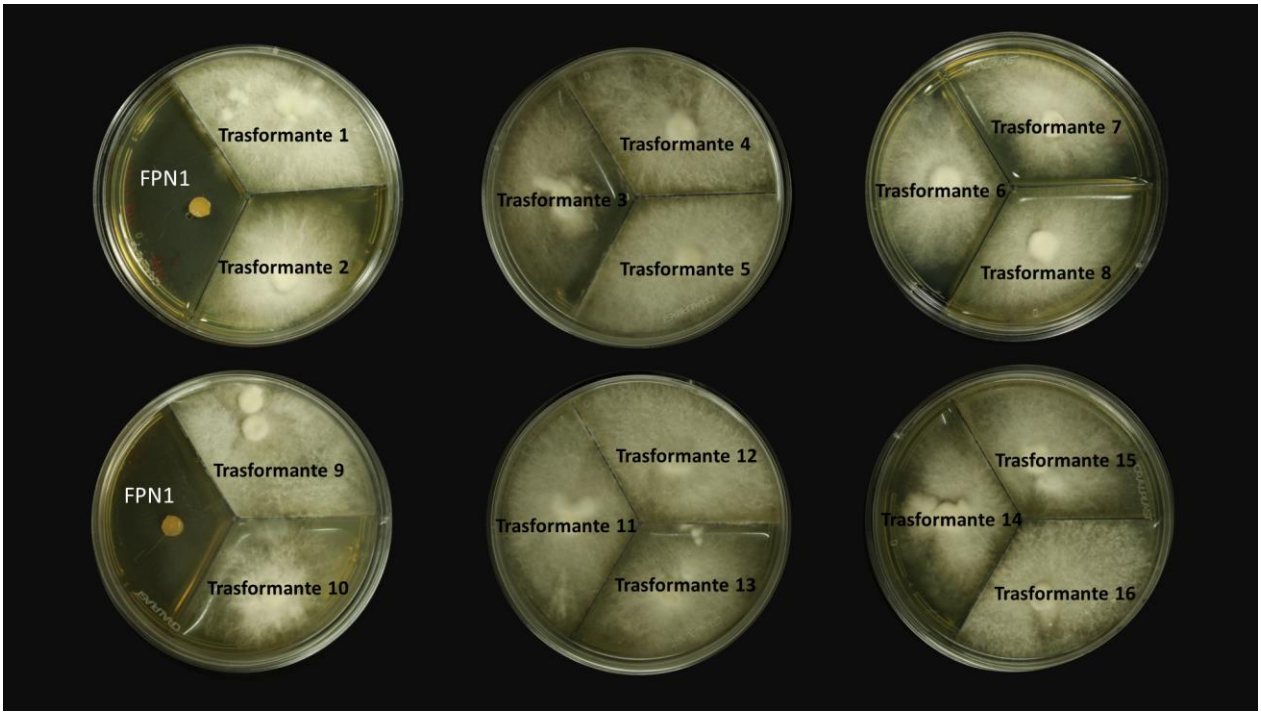

Figura 28. Repicagem de colônias transformantes de *M. perniciosa* em meio de cultura contendo higromicina B. Cada placa de Petri foi inoculada com três colônias. Com exceção das colônias à esquerda (FPN1, fungo selvagem), as outras 16 foram transformadas com um cassete carregando o gene de resistência à higromicina B. Cada colônia se originou de um protoplastos regenerado e, portanto, corresponde a um evento de transformação independente.

4.4 Discussão

A vassoura de bruxa, causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa,* é a principal doença que atinge a cultura do cacaueiro no Brasil. Desde a introdução desse fungo em nossa principal região produtora (estado da Bahia), o país, que até então era o segundo maior produtor do mundo, passou de exportador para importador de cacau

(MEINHARDT et al., 2008; PLOETZ, 2007). Dada a sua grande importância para a indústria chocolateira, diversos laboratórios no mundo vêm estudando este patógeno para entender melhor sua complexa biologia e, eventualmente, propor soluções para o problema. Apesar dos avanços acumulados nas últimas duas décadas, a obtenção de mutantes do fungo ainda não é possível, o que limita significativamente o estudo da doença.

A disponibilidade de métodos eficientes de manipulação genética é um requerimento para estudos de mecanismos moleculares em qualquer organismo. Muitas espécies, porém, são recalcitrantes a procedimentos de transformação genética e/ou e não apresentam alta frequência de recombinação homóloga. Não surpreendentemente, apenas algumas poucas espécies de basidiomicetos são atualmente manipuladas geneticamente (HONDA et al., 2019; IDNURM et al., 2017). Nos últimos anos, porém, tecnologias de edição de genomas baseadas no sistema CRISPR/Cas9 têm contribuído significativamente para a geração de indivíduos geneticamente manipulados de uma ampla diversidade de organismos, incluindo fungos (HUANG; SONG; YANG, 2019; LIU et al., 2020; ZHOU et al., 2019). Neste sentido, temos dedicado esforços para o estabelecimento de métodos eficientes de transformação de *M. perniciosa* para, subsequentemente, aplicarmos a técnica CRISPR/Cas9 na obtenção de mutantes de genes de interesse.

Nossos resultados abrem caminhos ainda inexplorados em nossa linha de pesquisa. A transformação do fungo tem se tornado uma prática rotineira em nosso laboratório e, notavelmente, tem apresentado elevada eficiência quando comparada com relatos anteriores (BARAU et al., 2015; CARIBÉ DOS SANTOS et al., 2009; LIMA et al., 2003; LOPES et al., 2008). Tipicamente, cada experimento resulta em centenas de colônias transformantes, o que é suficiente para todas as análises subsequentes que pretendemos realizar. Notamos, porém, que o número de transformantes obtidos é altamente dependente da qualidade e quantidade dos protoplastos produzidos na primeira etapa do protocolo. Isto pode explicar, por exemplo, a diferença no rendimento para as transformações de FPN1 (40 transformantes/µg; Figura 24) e WMA5 (5 transformantes/µg; Figura 25). Outros fatores, como características inerentes aos próprios isolados, podem influenciar a eficiência da transformação, mas isso ainda será

avaliado de forma sistemática. Destaca-se, ainda, que as linhagens transformantes têm se mostrado estáveis, uma vez que o fungo mantém a resistência ao antibiótico mesmo após sucessivas rodadas de subcultivo em meio de cultura. Dada a natureza do DNA utilizado (i.e., plasmídeo não linearizado), esperamos que o transgene seja integrado em posições aleatórias no genoma do fungo. De fato, esta integração explicaria a alta estabilidade das linhagens transformantes. A estabilidade é essencial para que, após a indução da produção de basidiomas, propágulos infectivos (i.e., basidiósporos) sejam obtidos para experimentos de inoculação de plantas. Na próxima etapa do projeto, pretendemos implementar a técnica CRISPR/Cas9 em *M. perniciosa* para, então, produzirmos mutantes que permitirão o estudo de fatores de virulência candidatos deste patógeno.

4.5 Conclusão e Perspectivas

Nossos resultados são promissores, visto que o protocolo foi repetido diversas vezes e por diferentes integrantes do grupo de pesquisa do LaGIP, obtendo-se sempre alta eficiência. Dessa forma, novas portas serão abertas para os nossos projetos, possibilitando testar novas construções de cassetes a serem introduzidas de maneira sistematizada no genoma do fungo. A perspectiva para nosso grupo é utilizar a tecnologia CRISPR/Cas9 para a obtenção de mutantes de genes codificadores de potenciais fatores de patogenicidade. Isso é essencial para o estudo de mecanismos moleculares, geração de conhecimento básico e completo entendimento da biologia deste fungo, o que pode apoiar o futuro desenvolvimento de estratégias de combate à vassoura de bruxa. Assim, a exemplo do trabalho apresentado no Capítulo I, uma vez identificados genes potencialmente responsáveis pela biossíntese de auxina, esperamos obter mutantes do fungo incapazes de produzir este hormônio. Dessa forma, será possível infectar plântulas de cacaueiro para avaliarmos se a auxina produzida pelo fungo é necessária para o desenvolvimento dos sintomas da doença e/ou para a virulência de *M. perniciosa*.

Referências

BARAU, J. et al. Apoplastic and intracellular plant sugars regulate developmental transitions in witches' broom disease of cacao. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 5, p. 1325–1337, mar. 2015.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. Birnboim H C & Doly J A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 6, p. 1513–1523, 1979.

CHEN, X. et al. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4510–4513, out. 2000

CARIBÉ DOS SANTOS, A. C. et al. dsRNA-induced gene silencing in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 11, p. 825–836, 1 nov. 2009.

DE O. BARSOTTINI, M. R. et al. Functional diversification of Cerato-Platanins in *Moniliophthora perniciosa* as seen by differential expression and protein function specialization. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 26, n. 11, p. 1281–1293, nov. 2013.

DÖRNTE, B.; KÜES, U. Reliability in transformation of the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 6, p. 340–355, 1 jul. 2012.

FIORIN, G. L. et al. Suppression of plant immunity by fungal Chitinase-like Effectors. **Current Biology**, v. 28, n. 18, p. 3023- 3030.e5, set. 2018.

GARCIA, O. et al. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, v. 111, n. 4, p. 443–455, 1 abr. 2007.

HONDA, Y. et al. Stable and transient transformation, and a promoter assay in the selective lignin-degrading fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 92, 24 jun. 2019.

HUANG, H.; SONG, X.; YANG, S. Development of a RecE/T-Assisted CRISPR–Cas9 Toolbox for *Lactobacillus*. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 7, p. 1800690, 2019.

IDNURM, A. et al. A silver bullet in a golden age of functional genomics: the impact of *Agrobacterium*-mediated transformation of fungi. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 6, 26 set. 2017.

LIMA, J. O. et al. Development of a transformation system for *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom in cocoa plants. **Current Genetics**, v. 42, n. 4, p. 236–240, jan. 2003.

LIU, K. et al. Dual sgRNA-directed gene deletion in basidiomycete *Ganoderma lucidum* using the CRISPR/Cas9 system. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 386–396, 2020.

LOPES, F. J. F. et al. Restriction enzyme improves the efficiency of genetic transformations in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease in *Theobroma cacao*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 27–34, fev. 2008.

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

PLOETZ, R. C. Cacao diseases: important threats to chocolate production worldwide. **Phytopathology**, v. 97, n. 12, p. 1634–1639, dez. 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 1989.

TEIXEIRA, P. J. P. L. et al. The fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa* has genes similar to plant pr-1 that are highly expressed during its interaction with cacao. **PLOS ONE**, v. 7, n. 9, p. e45929, 20 set. 2012.

TEIXEIRA, P. J. P. L. et al. High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **The Plant Cell**, v. 26, n. 11, p. 4245–4269, nov. 2014.

TEIXEIRA, P. J. P. L.; THOMAZELLA, D. P. DE T.; PEREIRA, G. A. G. Time for chocolate: current understanding and new perspectives on cacao witches' broom disease research. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 10, p. e1005130, 22 out. 2015.

THOMAZELLA, D. P. T. et al. The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. **New Phytologist**, v. 194, n. 4, p. 1025–1034, 2012.

ZHOU, D. et al. CRISPR/Cas9-assisted seamless genome editing in *Lactobacillus plantarum* and Its application in N-Acetylglucosamine production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 21, p. e01367-19, 2019.