



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Genômica funcional da interação cupuaçuzeiro
(*Theobroma grandiflorum*) e *Moniliophthora*
perniciosa, agente causal da vassoura de bruxa

Loeni Lüdke Falcão

Janeiro de 2023, Brasília -DF



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Genômica funcional da interação cupuaçuzeiro
(*Theobroma grandiflorum*) e *Moniliophthora*
perniciosa, agente causal da vassoura de bruxa

Loeni Lüdke Falcão

Orientador: Marcelo de Macedo Brigido
Coorientadora: Lucília Helena Marcellino

Tese apresentada ao departamento de Biologia
Celular do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade de Brasília como requisito parcial à
obtenção do grau de doutora em Biologia
Molecular

Janeiro de 2023, Brasília -DF

Banca Examinadora

Orientador, presidente da banca:
Professor Marcelo de Macedo Brigido
Universidade de Brasília

Coorientadora:
Dra. Lucilia Helena Marcellino
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Membro interno:
Professor Gabriel Sérgio Costa Alves
Universidade de Brasília

Membro externo 1:
Dra. Maria Fátima Grossi de Sá
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Membro externo 2:
Dr. Waldeyr Mendes da Silva
Presidência da República - Casa Civil

Membro externo 3, suplente:
Dra. Diva Maria de Alencar Dusi
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dedico a

Ciência

Meus filhos, Júlia Lüdke Falcão
e Frederico Lüdke Falcão

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha família, especialmente meu esposo João Filho, meus filhos Júlia e Frederico;

Agradeço meus orientadores Dra. Lucilia Helena Marcellino e Professor Dr. Marcelo de Macedo Brígido;

Agradeço a colega de laboratório Dra. Joseilde Oliveira Silva Werneck;

Agradeço outros colegas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia que fizeram parte da execução de experimentos, das análises de bioinformática, das análises estatística, na adaptação da metodologia de bioensaios, que auxiliaram de alguma forma na realização do trabalho de tese, troca de material, empréstimo de equipamentos, ou pelo apoio, conselhos, partilha de experiências;

Agradeço aos estudantes João Artur Rabelo e Lucas Bastos;

Agradeço a Embrapa, de forma especial a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;

Agradeço a UnB, especialmente a Pós graduação do Instituto de Biologia;

Agradeço Dr. Eder Marques da Silva e Dr. Antônio Figueira do CENA-USP;

Agradeço ao Dr. Ailton Reis da Embrapa Hortaliças e Dra. Ana Beatriz Zacaroni;

Agradeço ao Dr. Robert N. G. Miller da UnB;

Agradeço a banca de qualificação: Dr. Robert N. G. Miller, Dr. Francisco J. L. Aragão, Dr. Gabriel S. C. Alves e Dr. Waldeyr Mendes da Silva;

Agradeço a banca de defesa: Dra. Maria Fátima Grossi de Sá, Dr. Gabriel S. C. Alves, Dr. Waldeyr Mendes da Silva e Dra. Diva Maria de Alencar Dusi;

Agradeço a todos que apoiaram essa minha jornada de doutoramento!

Sumário	
RESUMO GERAL	9
Palavras chave:	10
ABSTRACT	11
Key words:	12
INTRODUÇÃO GERAL	13
Características socioeconômicas	13
Cupuaçu em sistema agroflorestal.....	15
Bancos de germoplasma	15
Programa de melhoramento	17
Patossistema <i>Theobroma-Moniliophthora perniciosa</i>	17
CICLO DA DOENÇA	19
Produção de esporos.....	19
Início da infecção	20
Fase biotrófica – estabelecimento da doença.....	21
Transição da fase biotrófica para necrótifica	24
Estudos moleculares relacionados a doença VB em cupuaçu.....	26
OBJETIVO	29
Objetivos específicos.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
CAPÍTULO I	37
Transcritômica comparativa do cupuaçu (<i>Theobroma grandiflorum</i>) oferece informações sobre os mecanismos iniciais de defesa contra <i>Moniliophthora perniciosa</i>, o agente causal da vassoura de bruxa	37
RESUMO	38
Comparative transcriptomics of cupuassu (<i>Theobroma grandiflorum</i>) offers insights into the early defense mechanism to <i>Moniliophthora perniciosa</i>, the causal agent of witches’ broom disease	39
ABSTRACT	39
INTRODUCTION	40
MATERIALS AND METHODS	42
Biological material and inoculation	42
RNA isolation	43
Library construction, sequencing, annotation, and data processing	44
Gene ontology (GO) annotation and enrichment analysis	45
Phytohormone signature analysis.....	45
Experimental validation of differential expression data using qRT-PCR	45

RESULTS.....	46
<i>T. grandiflorum</i> transcriptome assembly.....	46
Differential gene expression analysis.....	46
Pattern-recognition receptors.....	48
Transcription factors.....	50
Pathogenesis related proteins.....	52
Phytohormone signatures.....	54
GO enrichment analysis.....	56
DISCUSSION.....	59
<i>T. grandiflorum</i> transcriptome assembly.....	59
Differential gene expression.....	59
Pattern-recognition receptors.....	60
Transcription factors.....	61
Pathogenesis related proteins.....	62
Phytohormone signature analysis.....	63
GO enrichment.....	64
CONCLUSIONS.....	67
Supplemental Material.....	68
Figure S1.....	68
Table S3.....	71
Capítulo II-.....	83
Análise funcional de genes potencialmente relacionados à resistência e susceptibilidade à vassoura de bruxa em cupuaçuzeiro por expressão heteróloga em tomate Micro-Tom.....	83
RESUMO.....	83
ABSTRACT.....	84
INTRODUÇÃO.....	86
ERF9- (Ethylene-responsive transcription factor 9).....	86
PR5 -TLP1 (thaumatin like protein).....	88
PR10.1.....	90
MATERIAL E MÉTODOS.....	92
Construção de plasmídeos e transformação das plantas.....	92
Triagem de eventos transgênicos e análises de progênies.....	92
Quantificação do diferencial de expressão entre as linhagens.....	93
Material biológico e Produção de inóculos.....	94
Bioensaios em folhas destacadas.....	95

Bioensaios com plantas em casa de vegetação	96
Análise estatística.....	96
Hibridização <i>in situ</i>	97
RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
Bioensaios em folhas destacadas com <i>S. sclerotiorum</i>	99
Bioensaios em folhas destacadas com <i>V. dahliae</i>	101
Bioensaios com <i>V. dahliae</i> em casa de vegetação.....	102
Bioensaios com <i>F. oxysporum</i> em casa de vegetação	104
Bioensaios com <i>M. pernicioso</i> em casa de vegetação	107
Efeito de <i>TgPR10.1</i> na altura de tomate Micro-Tom	110
Localização de transcritos de <i>TgPR10.1</i> na ponta de galhos de <i>T. grandiflorum</i>	111
CONCLUSÃO	113
AGRADECIMENTOS	113
REFERÊNCIAS.....	113
CONCLUSÃO GERAL	124
ANEXOS	126
Banco de dados <i>Theobroma Grandiflorum</i>	126
Prêmio	126
Artigos e Boletins de Pesquisa publicados relacionados ao trabalho de tese.....	126

RESUMO GERAL

Theobroma grandiflorum é uma fruteira nativa da região amazônica e parente do cacau (*T. cacao*). Possui um enorme potencial econômico devido aos seus múltiplos usos nas indústrias alimentícia e cosmética. A cultura do cupuaçu é gravemente afetada pelo *Moniliophthora perniciosa*, fungo causador da vassoura de bruxa (VB), tanto no cupuaçu quanto no cacau. O conhecimento desse fitopatossistema é fundamental para propor estratégias de controle e mitigação dos danos causados pela VB a essas culturas. Para fornecer informações sobre a resistência do cupuaçu a *M. perniciosa*, os perfis transcritômicos de um genótipo resistente (clone 174) e um suscetível (clone 1074) foram analisados usando a tecnologia RNA-seq. Neste estudo, apresentamos a análise do transcriptoma de ambos os genótipos desafiados com *M. perniciosa*, em diferentes tempos de exposição ao patógeno, na fase inicial da infecção. Um total de 21.441 unigenes e 440 genes diferencialmente expressos (DEGs) foram identificados entre as diferentes condições. A análise de diferença intrínseca entre os genótipos mostrou 301 DEGs. A alteração da expressão gênica foi observada mais precocemente no genótipo suscetível 24 horas após a inoculação (hai). No genótipo resistente, a alteração foi mais acentuada às 48 hai. Este conjunto de dados permitiu a identificação de genes potencialmente envolvidos nos mecanismos de defesa, entre eles: receptores de reconhecimento de padrões (PRRs); fatores de transcrição; proteínas relacionadas à patogênese (PRs); proteínas relacionadas ao remodelamento da parede celular; genes relacionados ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e vias de terpenos. A análise da assinatura dos fitohormônios, em cada condição, revelou uma influência hormonal significativa nas respostas dos genótipos. Os genótipos diferiram principalmente em relação às respostas de auxina, citocinina, ácido salicílico e brassinosteróides. Este é o primeiro estudo de transcriptoma em larga escala de *T. grandiflorum*, que além de conhecimento sobre o processo de resistência, gerou uma lista de genes potencialmente importantes neste processo. Três genes desta lista foram selecionados para avaliação funcional por expressão heteróloga em tomate Micro-Tom (MT): 1) *TgERF9* que codifica para um fator de transcrição, 2) *TgTPL1* que codifica para uma proteína semelhante a taumatina e 3) *TgPR10.1*. As plantas transformadas, expressando o gene de interesse, foram desafiadas com fungos fitopatogênicos hemibiotróficos (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 e *Verticillium dahliae* raça 2 e um fungo necrotrófico (*Sclerotinia sclerotiorum*). As plantas MT_*TgERF9* e MT_*TgPR10.1* foram desafiadas com *M.*

perniciosa. Além disso, foi realizado um estudo da localização de transcritos de *TgPR10.1* nos tecidos da gema apical de cupuaçuzeiro, via hibridização *in situ* (ISH). Todos os patógenos foram capazes de colonizar os tecidos das plantas transformadas e não transformadas. Contudo, apesar de ser visível o escurecimento interno do caule nas plantas inoculadas com *Verticillium* e *Fusarium*, não foram observados sintomas de murcha, mesmo em situação de déficit hídrico. Além disso, o crescimento das plantas e a produção de frutos não foram alterados em função da infecção. No entanto, as plantas transformadas com *TgERF9* e *TgTLP1* apresentaram uma tendência a serem menores e menos produtivas. Os bioensaios com folhas destacadas indicam que a expressão de *TgTLP1* aumentou a suscetibilidade de MT ao fungo *S. sclerotiorum*. Plantas MT_TgPR10.1 apresentaram resistência moderada a *S. sclerotiorum*. A expressão deste gene em MT não afetou o desenvolvimento da VB. Entretanto, MT_TgPR10.1 apresentou alteração na altura, indicando alteração de balanço hormonal. No que se refere a localização dos transcritos de *TgPR10.1* em cupuaçu, foi possível identificar a expressão deste gene nos tricomas, no procâmbio, no meristema e nas células da epiderme dos primórdios foliares. A presença destes transcritos, particularmente no procâmbio, indica um papel desta PR no desenvolvimento e crescimento da planta, os quais são afetados por citocininas que são reguladores centrais da atividade cambial. Considerando que no desenvolvimento da VB, a hiperplasia e hipertrofia de tecidos são sintomas típicos da doença, o envolvimento deste gene no processo pode ser relevante. O banco de dados gerados pelo sequenciamento, o conhecimento gerado sobre os mecanismos de defesa nos estágios iniciais da interação Cupuaçu - *M. perniciosa* e o estudo de função de genes envolvidos nesses mecanismos podem ser recursos valiosos para análises mais profundas, fornecendo maiores esclarecimentos sobre os mecanismos envolvidos na resistência e suscetibilidade em cupuaçuzeiros, subsidiando o desenvolvimento de programas de melhoramento e de estratégias de controle de VB.

Palavras chave:

Expressão diferencial de genes, interação planta-patógeno, RNAseq, transcrito, cupuaçu, ERF9, Fator de transcrição responsivo a etileno, PR5, TLP1, Proteína similar a taumatina, PR10.1 e Micro-Tom

ABSTRACT

Theobroma grandiflorum is a fruit tree native to the Amazon region and a relative of cacao (*T. cacao*). It has a huge economic potential due to its multiple uses in the food and cosmetic industries. Cupuassu farming is seriously affected by *Moniliophthora perniciosa*, a fungus that causes witches' broom disease (WBD), in cupuassu, as well as in cacao. Knowledge about this phytopathosystem is essential for proposing strategies to control and mitigate the damage caused by WBD to these cultures. To provide insights into cupuassu resistance to *M. perniciosa*, the transcriptomic profiles of a resistant (clone 174) and a susceptible genotype (clone 1074) were analyzed using RNA-seq technology. In this study, we present the analyses of the transcriptome of both genotypes challenged with *M. perniciosa*, at different times of exposure to the pathogen, in the early stage of infection. A total of 21,441 unigenes and 440 differentially expressed genes (DEGs) were identified among the different conditions. The intrinsic difference analysis between the genotypes showed 301 DEGs. Gene expression alteration was observed earlier in the susceptible genotype at 24 hours after inoculation (hai). In the resistant one, the alteration was more prominent at 48 hai. These data set allowed the identification of genes potentially involved in the mechanism of defense, among them, pattern-recognition receptors (PRRs), transcription factors, pathogenesis related proteins (PRs), proteins related to cell wall remodelling, genes related to reactive oxygen species (ROS) accumulation and terpene pathways. The phytohormone signature analysis revealed a significant hormonal influence in genotypes' responses. The genotype differed mainly relatively to auxin, cytokinin, salicylic acid and brassinosteroids responses. This is the first large-scale transcriptome study of *T. grandiflorum*, which in addition to providing insights into the resistance process, generated a list of potentially important genes in this process. Three genes from this list were selected for functional evaluation by heterologous expression in Micro-Tom (MT) tomato: 1) the transcription factor *TgERF9*, 2) the thaumatin-like protein (*TgTLP1*) and 3) *TgPR10.1*. The transformed plants, expressing the gene of interest, were challenged with hemibiotrophic phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 3, *Verticillium dahliae* race 2) and a necrotrophic one (*Sclerotinia sclerotiorum*). MT_*TgERF9* and MT_*TgPR10.1* plants were challenged with *M. perniciosa*. Furthermore, a study of the localization of *TgPR10.1* transcripts in the tissues of the apical bud of cupuassu was carried out, via *in situ* hybridization (ISH). All fungal species were able to colonize plant tissues, either

transformed or non-transformed plants. However, despite the darkening into the stem of plants inoculated with *Verticillium* and *Fusarium*, wilt symptoms were not observed, even in a water deficit condition. Furthermore, plant growth and fruit production were not affected by infection. Plants transformed with *TgERF9* and *TgTLP1* tended to be smaller and less productive. The detached leaf bioassays indicate that the expression of *TgTLP1* increased the susceptibility of MT to the fungus *S. sclerotiorum*. MT_TgPR10.1 plants showed moderate resistance to *S. sclerotiorum*. Expression of this gene did not affect the development of WBD in MT. Nonetheless, MT_TgPR10.1 presented a height increase, indicating a change in hormonal balance. Regarding the location of the TgPR10.1 transcripts in cupuassu, it was possible to identify expression of this gene in the trichomes, in the procambium, in the meristem, and in the cells of the epidermis of the leaf primordia. The presence of these transcripts, particularly in the procambium, indicates a role for this PR in plant development and growth, which are affected by cytokinins, which are central regulators of cambial activity. Considering that in the development of witches' broom, tissue hyperplasia and hypertrophy are typical symptoms of the disease, the involvement of this gene in the process may be relevant. More detailed studies, such as measurements of phytohormones concentration, RNAseq and effects on endophytic organisms are necessary to better understand the function of these genes in the process of resistance and susceptibility to diseases. The database generated by sequencing, the insights about the defense mechanisms in the early stages of cupuassu- *M. pernicioso* interaction, and the study of the function of genes involved in these mechanisms can be a valuable resource for deeper analyses, which can help in the development of the cupuassu culture. These data can be a valuable resource for deeper analyses, providing further clarification of the mechanisms involved in resistance and susceptibility in cupuassu, supporting the development of its breeding programs and of strategies to control WBD.

Key words:

Differential gene expression; functional genomics; plant– pathogen interaction; RNA-Seq; transcriptome; Cupuassu, *Theobroma grandiflorum*, *Theobroma cacao* witches' broom disease, ERF9, Ethylene-responsive transcription factor, PR5, TLP1, Thaumatin-like protein, PR10.1, Micro-Tom

INTRODUÇÃO GERAL

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum) é uma planta nativa da região Amazônica, principalmente do Estado do Pará e do Estado do Maranhão (Ducke 1946, 1953) Cuatrecasas, 1964). Foi distribuída por toda região Norte, provavelmente pelas populações indígenas que viviam na Amazônia (Calzavara et al. 1984). Quanto à classificação botânica é da ordem Malvales; família Malvaceae; gênero *Theobroma*; espécie: *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.

Características socioeconômicas

A espécie *T. grandiflorum* é produzida em todos os estados da região Norte do Brasil, sendo Amazonas e Pará os principais estados produtores. Na região Nordeste, é cultivado comercialmente no Maranhão, na Bahia e Sergipe; no Centro Oeste, Tocantins, Mato Grosso e Goiás; no Sudeste, Rio de Janeiro e Espírito Santo, especialmente no município de Viana (IBGE, 2017, <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cupuacu/br>). Os dados de produção dessa cultura são um tanto escassos e desconhecidos. Pelo censo agropecuário de 2017 (IBGE, 2017) o Brasil produzia em torno de 21.240 toneladas de frutos por ano, em 15.747 estabelecimentos rurais, já a Secretaria de Estado de Desenvolvimento Agropecuário e Pesca do Pará - SEDAP <http://www.sedap.pa.gov.br/content/cupuacu>, apresenta dados em que o estado do Pará sozinho produziu em média de 30.000 toneladas de frutos por ano de 2013 a 2020, em aproximadamente 9.000 estabelecimentos.

A SEDAP tem estimulado o cultivo de cupuaçu distribuindo sementes (1,4 milhões) da cultivar BRS Carimbó desenvolvida pela Embrapa Amazônia Oriental (<http://www.sedap.pa.gov.br/content/cupuacu>, acessado 10/01/2023). No entanto, essa é uma cultura que ainda conta com pouco investimento em pesquisa. A cadeia produtiva ainda precisa ser devidamente estruturada e desenvolvida.

Cupuaçu além de ser um dos sabores tropicais, tipicamente brasileiro, foi designado fruta nacional pela Lei No 11.675, de 19 de maio de 2008. Essa cultura é importante para a economia de milhares de agricultores familiares e apresenta grande potencial para a bioeconomia nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosmético. Por ser uma cultura que se adapta ao cultivo agroflorestral, pode ser de grande valia no desafio

de conciliar o desenvolvimento econômico sustentável e a preservação da floresta e valorização da biodiversidade brasileira.

O fruto de cupuaçuzeiro pode ser aproveitado integralmente. A polpa é o principal produto tradicionalmente comercializado e utilizado *in natura*, ou desidratado, cristalizado, ou na forma dos mais variados doces. Toda via, são crescentes os estudos para uso da polpa para saborizar diferentes tipos de produtos como por exemplo, melhorando a palatabilidade de iogurte de leite de cabra; para fabricação de novos produtos, como panetones com farinha da casca e recheado com geleia de cupuaçu; para produção de barras de cereal e outros (Costa et al. 2022; Machado 2022). E ainda, estudos para uso da polpa de cupuaçu na produção de alimentos funcionais como probióticos (Pereira et al. 2017).

As amêndoas podem ser fermentadas e utilizadas na fabricação de um produto de sabor e textura similar a chocolate convencional, mas livre de cafeína e teobromina, o cupulate (de Nazaré et al. 1990; Cohen et al. 2004). Além disso, trabalhos para melhorar a palatabilidade do cupulate e uso do pó da amêndoa de cupuaçu em misturas com chocolates denotam que há espaço para crescimento do uso de amêndoas de cupuaçu no mercado de alimentos (Ramos et al. 2022). Os produtos derivados das amêndoas trazem um diferencial interessante, como no caso da manteiga que é mais macia que a de cacau, o que se deve ao alto teor ácidos graxos monoinsaturados, principalmente o ácido oleico (Ramos et al. 2022) e ao ponto de fusão mais alto, 33,9 °C, enquanto que na de cacau é 31°C. (Cohen et al. 2004). A maciez e o ponto de fusão mais baixo conferem aspecto mais liso e macio ao produto.

A casca do cupuaçu pode ser utilizada na alimentação humana ou animal. A farinha de casca de cupuaçu tem um ótimo valor nutricional, fonte de carboidratos e fibras e serve para usos diversos, entre eles panificação. Inclusive com a possibilidade de substituição total ou parcial da farinha de trigo pela farinha da casca de cupuaçu na elaboração de biscoitos, pães, cookies e outras massas (Silva et al. 2021; Machado 2022).

Além disso, estudos estão sendo feitos para que moléculas encontradas nos frutos de cupuaçu possam ser utilizadas na indústria farmacêutica (Assmann et al. 2021). Na semente de cupuaçu foram encontrados alguns flavonoides importantes como catequina e epicatequina, quercetina, kaempferol, entre outros (Pugliese et al. 2013). Jean-Marie e cols. relatam a presença de compostos polifenólicos sulfatados singulares denominados teograndina I e II e derivados da hipolaetina (Jean-Marie et al. 2022). O extrato de cupuaçu é fonte natural de antioxidantes com potencial efeito antidiabético.

Adicionalmente, a polpa pode ser usada na produção de probióticos ricos em polifenóis. Estudos para verificar a digestibilidade demonstram que extrato de cupuaçu não apresenta efeitos tóxicos e as sementes apresentam inibição de 97% de α -amilases e bioacessibilidade ao pirocatechol é boa, o que demonstra que não só essas moléculas estão presentes, mas como podem ser absorvidas quando são ingeridas.

Na literatura há relatos de possibilidades de aproveitamento da casca de cupuaçu na indústria de diversas formas: produção de carvão, o qual apresenta alto poder calorífico e devido à ausência de celulose e hemicelulose, sua combustão não produz alcatrões (Saraiva et al. 2004); produção de biossorvente para remoção de corantes têxteis de solução aquosa (Alves et al. 2022); produção de carvão microporoso pela ativação por KOH de cascas de cupuaçu carbonizadas para armazenamento de gás, incluindo adsorção de CO₂ (Cruz Junior et al. 2022). A análise termodinâmica revela que a pirólise da casca do cupuaçu é de natureza endotérmica e não espontânea, por isso a casca do cupuaçu pode ser considerada uma matéria-prima atraente para produção de bioenergia e produtos químicos de base biológica (Alves et al. 2022).

Cupuaçu em sistema agroflorestal

Os sistemas agroflorestais são uma forma sustentável para a agricultura, especialmente em solos menos férteis de terras altas da Amazônia Central. No entanto, muitas variáveis estão envolvidas no processo de adoção e manutenção desses sistemas. A manutenção do fluxo de material orgânico dentro de um contexto evolutivo considerando a mudança de combinação de plantas; (relações de complementaridade, suplementariedade ou competitividade) é fundamental para o sucesso destes sistemas, tanto do ponto de vista biológico quanto econômico. Alguns trabalhos de compatibilidade de espécies, estudos de efeito na fertilidade de solo, manejo do sistema e seleção de variedades de cupuaçu, por exemplo, mais adaptadas a esses sistemas, estão sendo conduzidos (Clough et al. 2009; Wade et al. 2010; Almeida et al. 2014; Alves et al. 2017, 2020, 2022; Rocha et al. 2019; Wemheuer et al. 2020), no entanto há ainda muito a ser feito para alavancar tecnológica e economicamente o uso desse sistema na produção de cupuaçu.

Bancos de germoplasma

As populações nativas são fundamentais para a sustentabilidade biológica do cupuaçuzeiro, pois são as únicas reservas de genes e genótipos do mundo. No entanto, o desmatamento para grandes projetos agropecuários, no Sudeste do Pará, causou a redução das populações nativas de cupuaçuzeiro resultando em erosão genética. A floresta do Polígono dos Castanhais, próximo à Marabá, também foi afetada, restando apenas algumas pequenas áreas de mata original, localizadas em reservas legais e áreas indígenas (Alves et al. 2014).

Segundo os dados divulgados em boletim da Embrapa, três bancos de germoplasma de cupuaçu, coleções *ex situ*, são mantidos no Brasil (Alves et al. 2007; Silva Junior et al. 2019):

- 1- Banco Ativo de Germoplasma de Cupuaçu da Embrapa Amazônia Ocidental (BAG Cupuaçu) Curadora: Aparecida das Graças Claret de Souza, Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, AM), localizado no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, Rodovia AM-010, km 29, Manaus, Coordenadas geográficas: 02°53'35,6"S e 59°58'21,2"W, implementado em 1984, contém 247 acessos, coletados no estado do Amazonas e Pará.
- 2- Banco Ativo de Germoplasma de Cupuaçuzeiro da Embrapa Amazônia Oriental, Curador: Rafael Moysés Alves. Esse banco é composto por seis coleções que estão localizadas no campo experimental da Embrapa Amazônia Oriental em Belém, PA, Travessa Dr. Enéas Pinheiro s/n, Belém, PA e no Campo Experimental de Tomé-Açu, Estrada da Jamic, km 6, Quatro Bocas, Tomé-Açu, PA, Coordenadas geográficas: 01°25'26,0"S e 48°24'05,8"W (Belém); 02°36'17,5"S e 48°21'38,3"W; e 02°36'17,3"S e 48°21'35,7"W (ambas em Tomé-Açu), implementado em 1986, contém 227, provenientes do Pará, Amazonas e Amapá.
- 3- Banco Ativo de Germoplasma de Cupuaçu da Embrapa Amapá, Curador: Raimundo Pinheiro Lopes Filho, localizado Experimental de Mazagão, Av. Intendente Alfredo Pinto, 01, União, Mazagão, AP. Coordenadas geográficas: 00°07'01"S e 51°17'15"W, implantado em 1998, e está com 154, provenientes do Amapá.

Os acessos foram coletados em áreas de ocorrência natural, plantios comerciais e pomares caseiros. Contudo há grande possibilidade da variabilidade genética conservada nessas coleções, ainda estar muito longe de contemplar uma amostragem significativa da população natural da espécie (Souza et al. 2017).

Programa de melhoramento

O programa de melhoramento genético de cupuaçu busca nos bancos de germoplasma a variabilidade para desenvolvimento de cultivares mais produtivas, e ao mesmo tempo, resistentes à principal doença da cultura, a vassoura de bruxa (VB), mantendo ou aumentando a qualidade de frutos (Alves et al. 2013). Uma nova praga, a broca do cupuaçuzeiro, vem ganhando importância na cultura do cupuaçu e precisa ser considerada pelo melhoramento genético. Além disso, o desenvolvimento tecnológico direcionado para usos de metabólitos presentes nos frutos de cupuaçu, pode abrir novas frentes de melhoramento.

Em 2002 foram lançadas as primeiras cultivares selecionadas para maior produtividade e resistência à vassoura de bruxa (BRS Coari, BRS Codajás, BRS Manacapuru e BRS Belém). Em 2012 foi lançada a cultivar BRS Carimbó.

Em 2021, a Embrapa lançou um pacote de cinco cultivares (Cupuaçu 5.0), que além de maior produtividade e resistência à VB, embute uma tecnologia de arranjos de plantio para superar o problema da autoincompatibilidade e colocar diversidade genética nos pomares. As cultivares clonais são as BRS Curinga, BRS Golias, BRS Careca, BRS Fartura e BRS Duquesa.

Os genótipos das cultivares do *KIT* cupuaçu 5.0 foram obtidos por meio da polinização controlada entre plantas de genótipos resistentes à vassoura de bruxa (174, 186, 215 e 220) e os que apresentavam alta produção (434, 228 e 185). As progênie obtidas foram avaliadas por quinze anos nos municípios paraenses: Belém e Tomé-Açu, para seleção dos genótipos. Na segunda etapa de avaliação, esses genótipos foram propagados vegetativamente e avaliados na forma de clones, no município de Tomé-Açu, na área experimental da Embrapa Amazônia Oriental, entre os anos de 2007 e 2017. Os clones foram gerados pela metodologia de mudas enxertadas e enxertia de plantas adultas, pela técnica de substituição de copa (Alves 2019).

Patossistema *Theobroma-Moniliophthora perniciosa*

O principal problema fitossanitário da cultura de cupuaçu é a doença VB, assim como na cultura de cacau na América tropical. A VB é causada pelo basidiomiceto *M. perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora 2006, anteriormente era denominado *Crinipelis perniciosa* (Aime e Phillips-Mora 2005). Esta doença diminui a produção pela infecção dos tecidos meristemáticos da almofada floral impedindo a formação dos frutos

ou infectando frutos jovens e desenvolvendo-se no interior dos frutos causando podridão na polpa e nas amêndoas. Além disso, pode infectar o meristema das gemas apicais causando enfraquecimento das plantas, devido ao desenvolvimento da doença nos galhos. Estudos conduzidos em cacau (Teixeira et al. 2014) mostram que a planta é induzida a drenar grande quantidade de fotossintatos para as regiões infectadas, prejudicando outras partes da planta. Os galhos infetados se tornam hipertrofiados e com quebra da dormência apical, gerando uma estrutura chamada de vassoura verde. O fungo infecta a planta e vive de forma biotrófica no espaço intercelular/apoplasto de 1 a 3 meses, até formação da vassoura verde (Evans 1980; Bastos and Evans 1985; Meinhardt et al. 2008). Quando as folhas ficam cloróticas, as folhas mais distantes começam a secar e progressivamente o galho seca até a região da infecção inicial, formando as vassouras secas, estrutura que inspirou o nome da doença, vassoura de bruxa. O fungo então passa a produzir grande quantidade de hifas saprofíticas, que se desenvolvem nos tecidos mortos e produzem estruturas reprodutivas (Evans 1980).

O processo de frutificação e liberação de basidiosporos é sensível às condições climáticas e ao tempo. A produção de basidiocarpos é estimulada por períodos secos e úmidos alternados. A formação de basidiósporos e esporulação pode ocorrer por vários anos sobre o mesmo material vegetal morto (Meinhardt et al. 2008). Por isso a prática da poda fitossanitária e destruição dos tecidos vegetais contaminados é essencial para redução de inóculo nos pomares. Mesmo as cultivares de cupuaçu lançadas recentemente não são 100% resistentes a doença vassoura de bruxa (Alves et al. 2021). A utilização do fungo *Trichoderma stromaticum*, Tricovab - produto comercial registrado pela CEPLAC, nas plantações, também mostrou ser capaz de diminuir as fontes de inóculo.

O conhecimento gerado sobre a doença é a partir de estudos em cacau. Não há registros de diferenças significativas entre as duas espécies, quanto ao desenvolvimento da doença. Considerando que as espécies de plantas são do mesmo gênero e que a espécie do fungo que causa a doença é a mesma, o conhecimento gerado para uma cultura tem sido aproveitado para as duas espécies. Contudo, mais esforços para estudar as particularidades da espécie *T. grandiflorum* podem revelar especificidades importantes.

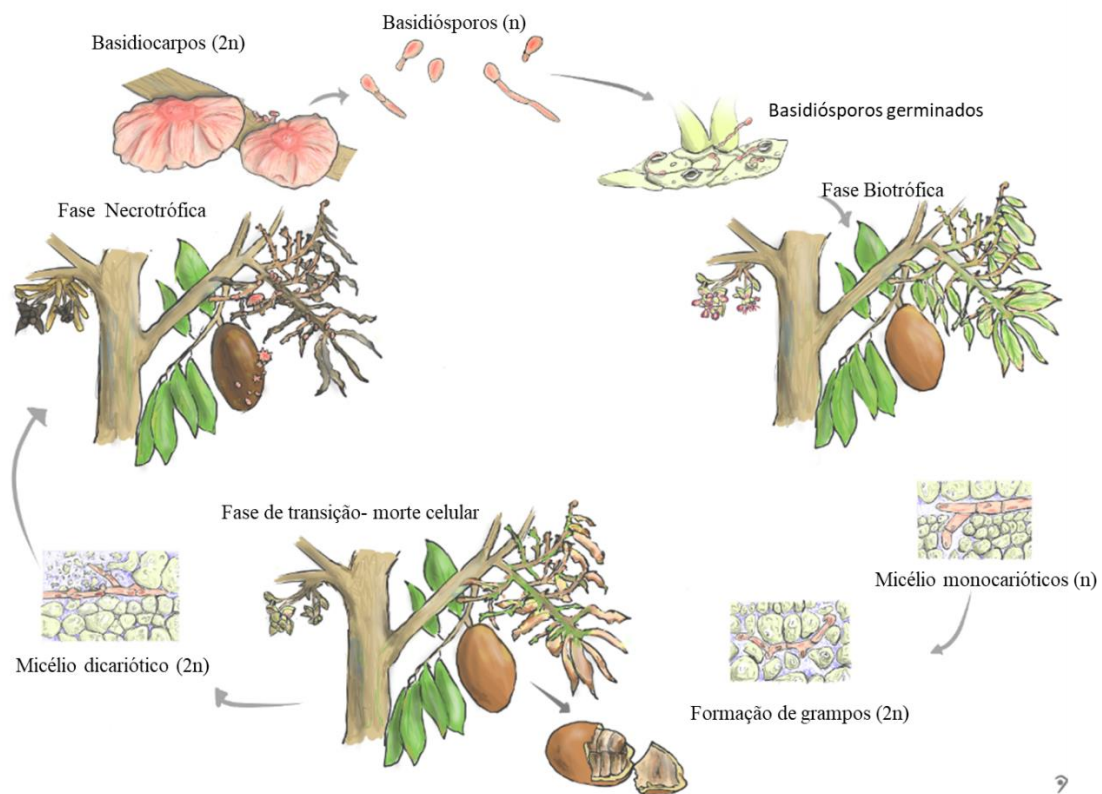


Figura 1. Ciclo de vida de *Moniliophthora perniciosa* em *Theobroma grandiflorum*. Adaptado de (Teixeira et al. 2015). Ilustrações: Júlia Lüdke Falcão

Acredita-se que *M. perniciosa* tenha se originado e coevoluído com plantas hospedeiras na bacia do alto rio Amazonas, no lado leste dos Andes (Purdy and Schmidt 1996). Esse fungo é capaz de colonizar várias espécies de plantas do gênero *Theobroma* e plantas de famílias não relacionadas, como *Solanaceae*. *M. perniciosa* é classificado em três biótipos de acordo com a especificidade do hospedeiro: o biótipo C infecta plantas da família *Malvaceae* (cupuaçu, cacau e outros), o biótipo S infecta membros da família *Solanaceae* (por exemplo, tomate) e o biótipo L é encontrado em associação com membros da família *Bignoniaceae* (por exemplo, lianas) (Meinhardt et al. 2008; Teixeira et al. 2015).

CICLO DA DOENÇA

Produção de esporos

Pequenos basidiomas cor de rosa (cogumelos) se formam sobre restos culturais, como vassouras secas e frutos que ficam presos às plantas ou que tenham sido retirados, como por ocasião da poda fitossanitária. A alternância de dias úmidos e dias secos é necessária para indução da formação dos basidiocarpos. A dispersão aérea dos basidiósporos ocorre principalmente durante os períodos noturnos e é feita pelas correntes de ar (Meinhardt et al. 2008).

Início da infecção

A infecção da planta inicia-se com a germinação dos basidiósporos, penetração do tubo germinativo e estabelecimento das hifas primárias no espaço intercelular. As hifas primárias apresentam pontas em forma de clavas que podem causar desintegração na cutícula para penetrar. As hifas penetram diretamente pela cutícula, pelas aberturas naturais na cutícula da epiderme e entre junções da parede celular, pela base dos tricomas e pelos estômatos (Sena et al. 2014). Estudos realizados nas décadas de 1980 e 1990 destacaram mais a penetração pela abertura dos estômatos e ferimentos na base de tricomas (Evans 1980; Kilaru and Hasenstein 2005).

Sena e cols. demonstraram que basidioesporos de *M. pernicioso* começam a germinar 2 horas após a inoculação (hai) em gemas apicais de genótipo suscetível (GS) de cacau variedade Catongo (Sena et al. 2014). Na superfície de genótipo resistente (GR) variedade CNN51 os basidioesporos demoraram mais tempo para germinar de 4 a 6 hai e o tubo germinativo estava menor. A penetração de hifas aconteceu da mesma maneira no GS e GR, todavia a quantidade de hifas que penetram no GR foi menor.

Nas superfícies dos tecidos vegetais, o fungo encontra moléculas secretadas pela planta e uma microbiota de organismos epifíticos, que junto com as células epidérmica, são a primeira barreira de proteção para planta. Mares e cols. demonstraram que componentes hidrossolúveis do filoplano dos mesmos genótipos citados acima, diminuíram a germinação e modularam o metabolismo de esporos de *M. pernicioso* durante a germinação (Mares et al. 2020). Os componentes retirados da superfície das folhas (filoplano) do genótipo resistente (GR) causaram diminuição do tubo germinativo do fungo e aumento de uma policetídeo ciclase relacionada a virulência e proteínas glicosídeo hidrolase, como celulases, xilanases, e poligalacturases, que degradam polissacarídeos de parede celular vegetal, mas que também podem ser reconhecidas por proteínas vegetais do tipo PRR (pattern recognition receptors), as quais ativam o sistema imune inato da planta. Adicionalmente houve o aumento de uma proteína de transporte

de múltiplas drogas. Essas proteínas transportadoras, geralmente, estão envolvidas no efluxo de substâncias tóxicas à planta. Já os componentes hidrossolúveis do filoplano do genótipo suscetível de cacau (GS) induziram menor expressão de proteínas Bip, que podem estar relacionadas a uma menor taxa de síntese de proteínas, o que sugere um baixo nível de estresse refletido pela menor atividades do retículo endoplasmático, onde essas proteínas atuam e são mais expressas em situação de estresse.

Estudos microscópicos e identificação de moléculas secretadas pela planta e fungo, nesta fase de contato, específicos para *T. grandiflorum* ainda não estão disponíveis.

No capítulo I dessa tese, são apresentados alguns genes que codificam para PRRs, cujos transcritos estavam em nível mais alto no GR. Essas proteínas transmembranares podem estar envolvidas no reconhecimento de PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) e DAMPs (damage-associated molecular patterns) relacionados a infecção por *M. perniciosa* em *Theobroma*.

Fase biotrófica – estabelecimento da doença

Nesta fase, as hifas de *M. perniciosa* são hialinas e inchadas, monocarióticas assexuadas, crescem exclusivamente no espaço extracelular e não apresentam grampos, sendo que a densidade do micélio é baixa. (Evans 1980; Sena et al. 2014).

M. perniciosa é um fungo hemibiotrófico atípico, que apresenta uma longa fase biotrófica, de um a três meses (Teixeira et al. 2015). Nesta fase, aparecem os sintomas característicos da doença e ocorrem pequenas variações nos sintomas entre as espécies *T. cacao* e *T. grandiflorum*, pode ocorrer pequenas varrições entre cultivares, entre galhos de plantas adultas e mudas. Contudo, há um padrão de comportamento partilhado, como indução de hiperplasia de tecidos, que formam um inchaço na região da infecção, desenvolvimento de galhos com internódios curtos e, posteriormente, desenvolvimento de várias ramificações laterais, devido à quebra de dormência apical. Esses sintomas aparecem de 15 a 30 dias após a infecção (dai) (Silva et al. 2002). Quando a infecção acontece na almofada floral, pode ocorrer abortamento de flores, formação de brotações no caule ou a formação de frutos partenocárpico que ficam pequenos e atrofiados. Porém quando a infecção ocorre nos frutos jovens, esses crescem aparentemente de forma normal, no entanto, a doença se desenvolve no interior do fruto, quando os frutos amadurecem, manchas escuras aparecem na casca e a polpa e as sementes ficam danificadas (Silva et al 2002).

No estudo via microscopia, conduzido por (Sena et al. 2014), foram observadas diferenças importantes entre GS e GR de cacau:

Genótipo suscetível: os primeiros sinais da doença apareceram dai. Aos 60 dai as vassouras típicas estavam completamente formadas, células do córtex, floema, xilema e medula estavam hipertrofiados, distorcidos, desorganizados e significativamente maiores do que em mudas saudáveis não inoculadas. A colonização pelo fungo era intensa e as hifas intercelulares variaram de 6,44 a 15,6 μm de largura (Sena et al. 2014).

Genótipo resistente: Entre 35 e 42 dai os sinais de doença começaram a aparecer. Aos 60 dai havia formação de vassouras pequenas, com 4 cm de comprimento e raramente aparecia inchaço no caule. O córtex e o floema apresentavam hipertrofia leve e com menos inclusões que no GS. Além do número de infecções ser menor, a quantidade de micélio encontrado era menor e com segmentos de hifas intercelulares mais curtos e mais finos (largura média; GS-10,9 μm , GR- 6,72 μm). A restrição da proliferação do patógeno apareceu associada as reações de defesa do hospedeiro, caracterizadas pelo aparecimento de periderme e presença de células necróticas no córtex. Não foram identificadas hifas colonizando tecidos numa distância maior que 5 a 10cm a partir do ponto de colonização na fase biotrófica (Sena et al. 2014).

A avaliação da presença de amido em GS e GR, por microscopia, identificou a presença de grãos principalmente na medula, raios do xilema e tecidos corticais. A quantidade de grãos de amido variou entre os genótipos, mas sempre foi maior nas plantas não inoculadas (Sena et al. 2014).

Teixeira e cols. avaliaram a presença de amido em mudas de GS aos 30 dai com *M. pernicioso*, fase em que as vassouras estão formadas e as folhas da vassoura estão cloróticas (Teixeira et al. 2014). Também encontraram diminuição drástica da quantidade de amido nos tecidos infectados. O RNAseq dessas mudas e a análise do diferencial de expressão dos genes contrastando plantas saudáveis (não inoculadas) e plantas doentes, mostraram que genes associados com a degradação de carboidratos e lipídios (amido e triacilglicerol, respectivamente) foram regulados positivamente, incluindo genes que codificam amilases e lipases. Em paralelo, genes necessários para a degradação de sacarose (invertase da parede celular) e transporte de hexose (transportadores de hexose) foram regulados positivamente nas plantas doentes, enquanto outros genes relacionados a fotossíntese foram regulados negativamente, indicando que a doença interfere na fisiologia normal dos tecidos meristemáticos, de maneira que suas células mantêm a

capacidade de dreno primário. Fotossintatos produzidos pela planta são continuamente translocados para os tecidos com células dreno.

Além disso, *M. pernicioso* produz a proteína metanol oxidase (MOX), que é secretada no espaço extracelular e possui todos os genes classicamente relacionados ao metabolismo do metanol. Em função disso, foi proposto a existência de uma via de metabolismo de metanol independente de peroxissomos para *M. pernicioso*. A expressão relativa de *Mp-mox*, em diferentes fases de desenvolvimento da doença, está correlacionada com os níveis de expressão de *Mp-pme* (pectin methylesterase) e com a redução no nível de esterificação de metila, o que indica que esse fungo metaboliza o metanol gerado pela degradação da pectina (de Oliveira et al. 2012). Análises do transcriptoma de *M. pernicioso*, colonizando vassouras verdes, identificou altos níveis de expressão de genes que codificam para enzimas pectinolíticas, entre elas, pectina metilesterases, poligalacturonases e pectato liases. Também foram identificados transcritos de genes envolvidos no metabolismo de subprodutos da degradação da pectina (genes que codificam para metanol oxidase, formaldeído desidrogenase e formato desidrogenase) (Teixeira et al. 2014).

Muitos genes putativos que codificam celulases, xilanases, arabinofuranosidases, manosidases e acetilesterases foram identificados diferentemente expressos em hifas colonizando vassoura verde, indicando que o fungo degrada celulose e hemicelulose. Paralelamente, na planta, genes associados ao metabolismo secundário e à modificação da parede celular, também estão com expressão muito aumentada (Teixeira et al. 2014).

Uma característica do transcriptoma de vassoura verde é a prevalência de transcritos relacionados a respostas de defesa. Genes que codificam putativos receptores imunológicos como RLPs e RLK (entre eles 30 receptores da família NB-LRR) foram induzidos pela infecção por *M. pernicioso*. Esses genes codificam proteínas intracelulares que reconhecem direta ou indiretamente efetores de patógenos, levando a fortes respostas de resistência. E de fato, foram identificados 67 genes que codificavam para proteínas responsivas a patogêneses (PR1, PR2/ β -1-3-glucanase, PR-3, PR-4, PR-8, PR-11/quitinase, PR-5/taumatina, PR-6/inibidor de protease, PR-9/oxidase e PR-10/ribonuclease), além desses, 16 fatores de transcrição WRKY, três inibidores de protease Kunitz e três NADPH oxidases/responsáveis pela produção de íons superóxido. Apesar de altamente ativadas essas respostas de defesa não são efetivas para controlar a vassoura de bruxa. O transcriptoma do fungo, colonizando esses mesmos tecidos, revela que *M. pernicioso* expressa um arsenal de genes que codificam enzimas envolvidas na

desintoxicação e tolerância ao estresse. Entre eles, estão genes que codificam as enzimas: i) antioxidantes superóxido dismutase e catalase, as quais conferem ao fungo capacidade de lidar com a toxicidade de ROS, ii) glutathione sintase, que catalisa a etapa final da via de biossíntese da glutathione, iii) 12 genes que codificam enzimas do citocromo P450 (Teixeira et al. 2014). Esses dados corroboram com a análise de rotas identificadas nas análises a partir do genoma de *M. perniciosa* (Mondego et al. 2008).

Outro ponto importante na fase biotrófica da doença é a ativação e regulação de vias de fitohormônios. A análise transcritômica de tecidos de vassoura verde revelou a regulação positiva de genes de cacau relacionados à resposta de auxina (IAA), a biossíntese e resposta de giberelinas e degradação de etileno (ET) e citocinina (CKs) (Teixeira et al. 2014). A habilidade de *M. perniciosa* de produzir e crescer na presença de altas quantidades de IAA, ácido salicílico (SA) (Kilaru et al. 2007) e CKs (Costa et al. 2021) indica que esses hormônios estão envolvidos na patogenicidade do fungo e no desenvolvimento dos sintomas na planta. Ácido abscísico (ABA) e ácido jasmônico (JA) endógenos, também foram identificados em micélio de *M. perniciosa*. Por outro lado, Litholdo e cols. identificaram a indução, exclusivamente no GR, (CAB214) de genes relacionados a ativação da rota de sinalização JA/ET (*Allene Oxide Synthase-TcAOS*) e *S-Adenosylmethionine Synthetase-TcSAM*) (Litholdo et al. 2015).

Transição da fase biotrófica para necrótifica

A partir da análise do genoma de *M. perniciosa* (Mondego et al. 2008), foi identificado um gene que codifica uma oxidase mitocondrial alternativa (AOX). Este gene (*Mp-aox*) atua em uma via respiratória alternativa à cadeia respiratória dependente de citocromo (CRC) ‘convencional’ e universalmente conservada, que envolve os complexos respiratórios III e IV. A caracterização de *Mp-aox* mostra uma clara correlação entre o estilo de vida hemibiotrófico desse fungo e a funcionalidade das vias respiratórias mitocondriais e sugere que AOX permite que a respiração continue durante os estágios iniciais da infecção, quando o patógeno precisa sobreviver em um ambiente hostil estabelecido pelo sistema de defesa do hospedeiro. Também foi demonstrado que a inibição do CRC manteve o fungo em seu estágio monocariótico, enquanto era sustentado pela respiração dependente de AOX (Thomazella et al. 2012).

Thomazella e cols. propõem que a geração de óxido nítrico (NO) durante a infecção pode ser o fator responsável para o controle do desenvolvimento biotrófico de

M. pernicioso na planta (Thomazella et al. 2012). Sendo que com a morte dos tecidos vegetais, a inibição dependente de NO da cadeia respiratória convencional (CRC) cessaria, e um aumento na relação citocromo/AOX forneceria a energia necessária (ATP) para o crescimento intenso de patógenos durante a fase necrotrófica. Neste contexto, AOX pode ser um interruptor que regula o desenvolvimento dessas duas estratégias de vida em *M. pernicioso* (fases biotrófica e necrotrófica).

Barau e cols, propuseram outro modelo para explicar a transição de fase biotrófica para necrotrófica (Barau et al. 2015), porém essa proposta pode ser complementar à de Thomazella e cols (Thomazella et al. 2012). O modelo considera que a privação de carbono é um componente de sinalização que controla a duração da fase biotrófica da VB. O início da fase necrotrófica é marcado pela regulação positiva do gene *MpNEP2*, que codifica para um efector semelhante ao NEP, o qual necrosa tecidos de planta (Garcia et al. 2007; Zapparoli et al. 2009). Barau e cols demonstraram que a falta de carbono solúvel no apoplasto ativa a expressão de genes que codificam para proteínas necrotróficas (*MpNEP2*) (Barau et al. 2015). Quando o fungo é cultivado em meio pobre de carboidratos, o processo de autofagia é desencadeado induzindo expressão de *MpNEP2*. Ocorre, também, o aparecimento de um fenótipo peculiar no micélio, crescimento lento, seguido pelo desenvolvimento de setores de crescimento mais rápido formados por micélios muito finos com acentuada ramificação hifálica, típica do crescimento invasivo.

Alvin e cols. propuseram que a troca de fase biotrófica para necrotrófica em *M. pernicioso* estava relacionada com nível de ROS nos tecidos e processo de autofagia (Alvim et al. 2009). Isso mostra que a proposta de Thomazella e cols e Barau e cols são complementares (Thomazella et al. 2012, Barau et al. 2015) Além disso, Ceita e cols. (2007) propõem que o acúmulo de cristais de oxalato de cálcio nos tecidos infectados *M. pernicioso* podem estar envolvidos na morte celular na fase de transição. Plantas suscetíveis apresentam maior acúmulo desses cristais (Ceita et al. 2007).

Barau e cols. enfatizam que a expressão de *MpNEP2* no início da senescência, ativada pela falta de carbono no fluido apoplástico, é muito vantajosa para as hifas extracelulares de *M. pernicioso*, pois isso, dá acesso rapidamente aos tecidos ricos em carbono e nitrogênio (Barau et al. 2015). Além disso, a aceleração da necrose do tecido infectado pela atividade de *MpNEP2* pode prevenir duas importantes características da senescência tardia: remobilização de carboidratos pela planta e abscisão dos tecidos mortos. O fato dos galhos e frutos mortos permanecerem fixos a planta é vantajoso para o patógeno, pois evita a competição com outros microrganismos que habitam a

serrapilheira da floresta, adicionalmente, a altura dos basidiomas pode aumentar a dispersão de esporos.

Na fase necrotrófica, que ocorre após a morte dos tecidos infectados nas chamadas vassouras secas ou frutos secos, o crescimento do micélio é intracelular e abundante e as hifas são sexuadas, dicarióticas e apresentam grampos de conexões (Purdy and Schmidt 1996).

Estudos moleculares relacionados a doença VB em cupuaçu

Para cupuaçu existe pouca informação disponível nos bancos de dados de sequências gênicas. No NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, acessado em janeiro de 2023) até aquela data foram depositadas sequências dos genes WRKY, inibidor de tripsina, vicilina e um ribossomal (Kuhn et al. 2010), sequência parcial do genoma do cloroplasto (Niu et al. 2019) e o genoma mitocondrial (de Abreu et al. 2023).

Devido ao potencial de uso de *T. grandiflorum* em estudos de genômica comparativa com cacau e a possibilidade de geração de híbridos inter-espécie (cacau-cupuassu), Kuhn e cols., avaliaram o uso de marcadores microssatélites, SSCPs (Single-strand conformational polymorphism) e SNPs (single nucleotide polymorphism) desenvolvidos para cacau nas análises de genótipos de *T. grandiflorum* e híbridos interespecíficos. As avaliações em *T. grandiflorum* desses marcadores genéticos, baseados em PCR, mostraram que similaridade de sequência entre *T. grandiflorum* e *T. cacao* é alta, o que se refletiu no sucesso da amplificação de quase todos os marcadores de cacau em cupuaçu. Vinte e seis de 30 de microssatélites (87%) foram amplificados (Kuhn et al. 2010). Foi demonstrado que os marcadores SSCPs desenvolvidos para cacau e usados para analisar *T. grandiflorum* são mais sensíveis que os microssatélites de cacau na identificação de diferenças espécie-específicas, embora não sejam amplamente utilizados devido a restrições técnicas. Observaram que marcadores SNPs projetados para *T. cacao* não foram úteis para estimar a diversidade em *T. grandiflorum*. Identificaram SNPs intra-específicos que podem ser usados para avaliar a heterozigosidade em *T. grandiflorum* e SNPs específicos da espécie que ajudarão na caracterização de híbridos interespecíficos (Kuhn et al. 2010).

Estudos moleculares mostraram, que assim como as outras espécies do gênero *Theobroma L.*, *T. granfiflorum* apresentada $2n= 20$ pequenos cromossomos. Neste

mesmo estudo EST-SSRs desenvolvidos para cacau se mostraram úteis para cupuaçu (Silva et al. 2017).

A partir do uso combinado de genotipagem de alto rendimento por sequenciamento (GBS) e do genoma de referência de uma espécie relacionada, *T. cacao*, foi desenvolvido um grande conjunto de marcadores SNP para *T. grandiflorum* de uma população biparental (174 resistente × 1074 clone suscetível a *M. perniciosa*). A partir disso, foi possível construir o primeiro mapa genético de alta densidade, compreendendo 1438 marcadores SNPs e 10 SSR. A análise da sintonia entre *T. cacao* e *T. grandiflorum* mostrou que a homologia média entre os grupos de ligação das duas espécies foi de 97,2%. O mapa genético permitiu a detecção e caracterização de um QTL de resistência a WBD, a partir de observações no cruzamento 174 × 1074, que foi identificado no cromossomo 6 do pai resistente 174 no marcador 6M1252980. Os dados fenotípicos associados a esse QTL corresponderam a observações após infecção natural e artificial com *M. perniciosa* nas duas espécies. O gene *TgPR3*, potencialmente envolvido na resposta a VB em cupuaçu (Silva et al. 2020) foi colocalizado com essa QTL (Mournet et al. 2020).

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia dispõe de um banco de sequências de transcritos de *T. grandiflorum*, gerado a partir do sequenciamento do transcrito de: i) frutos de cupuaçu; ii) ricas em tecidos meristemáticos retiradas de mudas e iii) gemas apicais de ponta de galhos (0,5 cm) de árvores de 3 anos (clones do GR 174 e GS 1074). Os resultados estão apresentados no Capítulo I desta tese (Falcão et al. 2022). Os dados desse banco de sequência estão sendo utilizados para diversos estudos moleculares realizados pela equipe composta por membros da Embrapa (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Brasília), Ceplac (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - Bahia e Para), UESC (Universidade Estadual de Santa Cruz - Bahia) e Cirad (Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agrônômica para o Desenvolvimento - França).

A partir dessas sequências de RNAs de frutos foram desenvolvidos os primeiros marcadores moleculares EST-SSR (microsatélites de ESTs) de *T. grandiflorum* (Santos et al. 2016a). Em outro trabalho foram identificados e selecionados genes que podem ser utilizados como normalizadores em estudos de expressão de genes em polpa e sementes de cupuaçu (Santos et al. 2016b). Silva e cols. (2020) estudaram a função dos genes que codificam para proteínas responsivas à patogênese *TgPR3*, *TgPR5* e *TgPR8* que estavam altamente expressas no GR nos estágios iniciais da infecção. Os dados desse trabalho

sugerem que essas TgPRs estão envolvidas no reconhecimento de mecanismos do sistema imunológico inato da planta por meio de receptores de quitina. Além disso sugerem um possível papel de quitinase/quitosanase para o TgPR5/osmotina (Silva et al. 2020).

Santos e cols. fizeram análises de expressão e interatoma de genes que estão envolvidos na qualidade e/ou resistência de frutos, as quais permitiram identificar vários mecanismos moleculares e fisiológicos associados a esses processos vegetais. Adicionalmente, identificam genes (*TgSTP1*, *TgWRKY33*, *TgCZF1* e *TgUBA1* em cupuaçu e os ortólogos de *DIN10*, *CN11* e *TET8*) que podem ser bons candidatos para seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento com foco tanto na qualidade dos frutos, quanto na resistência/tolerância a estresses bióticos e abióticos (Santos et al. 2022).

Apesar de esforços recentes de um conjunto de instituições (Embrapa, Ceplac, UESC, Cirad, USP), o cupuaçuzeiro ainda carece de informações que possibilitem o desenvolvimento de ferramentas que aceleram os procedimentos de seleção e dinamizem o programa de melhoramento da espécie, aliando economia de tempo com redução dos custos de pesquisa. A falta de informação ocorre tanto do ponto de vista de genética molecular (envolvendo marcadores) quanto de dados ômicos, fazendo-se necessário: i) ampliar o conhecimento a respeito das associações entre características genômicas e fenotípicas; ii) gerar dados ômicos em grande quantidade, por RNAseq e sequenciamento de pequenos RNAs (microRNAs e siRNAs); iii) avaliar funcionalmente de genes identificados e; iv) identificar moléculas bioativas que possam ser utilizadas no controle de *M. perniciosa*.

OBJETIVO

Aumentar o conhecimento a respeito da resistência de cupuaçu a *M. perniciosa*, visando compreender melhor o processo de resistência do cupuaçuzeiro a esse fungo.

Objetivos específicos

Gerar um banco de dados com sequências de transcritos para estudos da interação planta/patógeno, assim como a sequência de transcritos do meristema apical – alvo primário de *M. perniciosa*.

Identificar diferenças na expressão de genes, em resposta a inoculação com *M. perniciosa*, de genótipos de cupuaçu resistentes e suscetíveis a vassoura de bruxa.

Selecionar genes com potencial para usos biotecnológicos e elucidar a função dos mesmos via expressão em tomate Micro-Tom.

Aumentar o conhecimento a respeito dos genes expresso no meristema apical de cupuaçu.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aime MC, Phillips-Mora W (2005) The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97:1012–1022. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832751>
- Almeida OF, Alves RM, Oliveira HO, Fernandes JRQ (2014) Concorrência promovida pelo taperebazeiro sobre o cupuaçuzeiro, em sistema agroflorestal. 18 Semin Iniciação Científica e 2 Semin Pós-graduação da Embrapa Amaz Orient
- Alves JLF, da Silva JCG, Mumbach GD, et al (2022) Evaluating the bioenergy potential of cupuassu shell through pyrolysis kinetics, thermodynamic parameters of activation, and evolved gas analysis with TG/FTIR technique. *Thermochim Acta* 711:. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2022.179187>
- Alves RM, Chaves SF da S (2019) Cultivares clonais de cupuaçuzeiro recomendadas para o estado do Pará. Comunicado Técnico - Série Embrapa, 1-11
- Alves RM, Chaves SF da S, Alves RS, et al (2021) Cupuassu tree genotype selection for an agroforestry system environment in the Amazon. *Pesqui Agropecu Bras* 56:1–10. <https://doi.org/10.1590/s1678-3921.pab2021.v56.02139>
- Alves RM, Chaves SF da S, Bastos AJR (2020) Viability of the use of *African mahogany* with cupuassu tree in agroforestry system (Afs). *Rev Arvore* 44:1–10. <https://doi.org/10.1590/1806-908820200000007>
- Alves RM, Filgueiras GC, Homma AKO (2014) Aspectos sócio-econômicos do cupuaçuzeiro na amazônia: do extrativismo a domesticação. In: Mercado, Cadeia Produtiva e Desenvolvimento Rural na Amazônia, 1ª ed. Belém, PA, p 197–223
- Alves RM, Sebbenn AM, Artero AS, et al (2007) High levels of genetic divergence and inbreeding in populations of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). *Tree Genet Genomes* 3:289–298. <https://doi.org/10.1007/s11295-006-0066-9>
- Alves RM, Silva CR de S, Albuquerque PSB de, Santos VS dos (2017) Caracterização fenotípica, genotípica e compatibilidade entre genótipos para seleção de clones elite de cupuaçuzeiro. *Acta Amaz* 47:175–184. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201602104>
- Alves RM, Silva CR de S, Silva MS da C, et al (2013) Diversidade genética em coleções amazônicas de germoplasma de cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.]. *Rev Bras Frutic* 35:818–828. <https://doi.org/10.1590/s0100-29452013000300019>

- Alvim FC, Mattos EM, Pirovani CP, et al (2009) Carbon source-induced changes in the physiology of the cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* (Basidiomycetes) affect mycelial morphology and secretion of necrosis-inducing proteins. *Genet Mol Res* 8:1035–1050. <https://doi.org/10.4238/vol8-3gmr619>
- Andrade JKS, Barros RGC, Pereira UC, et al (2022) α -Amylase inhibition, cytotoxicity and influence of the in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds in the peel and seed of *Theobroma grandiflorum*. *Food Chem* 373:131494. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131494>
- Assmann CE, Weis GCC, da Rosa JR, et al (2021) Amazon-derived nutraceuticals: Promises to mitigate chronic inflammatory states and neuroinflammation. *Neurochem Int* 148:. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105085>
- Barau J, Grandis A, Carvalho VMDA, et al (2015) Apoplastic and intracellular plant sugars regulate developmental transitions in witches' broom disease of cacao. *J Exp Bot* 66:1325–1337. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru485>
- Bastos CN, Evans HC (1985) A new pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. *Plant Pathol* 34:306–312. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1985.tb01366.x>
- Calzavara B, Muller C, Da costa O (1984) Fruticultura tropical: O Cupuaçuzeiro. *Boletim Informativo - Série Embrapa*, p1-104
- Ceita G de O, Macêdo JNA, Santos TB, et al (2007) Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Sci* 173:106–117. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.04.006>
- Clough Y, Faust H, Tschardt T (2009) Cacao boom and bust: sustainability of agroforests and opportunities for biodiversity conservation. *Conserv Lett* 2:197–205. <https://doi.org/10.1111/j.1755-263x.2009.00072.x>
- Cohen KDO, Mattietto R, Jackix MDNH (2004) Processo de torração das amêndoas e Nibs de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). *Comunicado Técnico - Série Embrapa* 21
- Costa JL, Paschoal D, da Silva EM, et al (2021) *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. *New Phytol* 231:365–381. <https://doi.org/10.1111/nph.17386>
- Costa MP, Rosario AILS, Silva VLM, et al (2022) Rheological, Physical and Sensory

- Evaluation of Low-Fat Cupuassu Goat Milk Yogurts Supplemented with Fat Replacer. *Food Sci Anim Resour* 42:210–224.
<https://doi.org/10.5851/kosfa.2021.e64>
- Cruz Junior OF, Campello I, Mirian G, et al (2022) Enhanced - CO₂ capture by cupuassu shell - derived activated carbon with high microporous volume. *Carbon Lett.* <https://doi.org/10.1007/s42823-022-00454>
- Silva RA, Souza G, Lemos LSL, et al (2017) Genome size, cytogenetic data and transferability of EST-SSRs markers in wild and cultivated species of the genus *Theobroma* L. (Byttnerioideae, Malvaceae). *PLoS One* 12:1–15.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170799>
- de Abreu VAC, Moysés Alves R, Silva SR, et al (2023) Comparative analyses of *Theobroma cacao* and *T. grandiflorum* mitogenomes reveal conserved gene content embedded within complex and plastic structures. *Gene* 849
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146904>
- de Nazaré RFR, Barbosa WC, Viégas RMF (1990) Processamento de sementes de cupuaçu para obtenção de cupulate. *Embrapa-Cpatu* 108:38
- de Oliveira B V, Teixeira GS, Reis O, et al (2012) A potential role for an extracellular methanol oxidase secreted by *Moniliophthora perniciosa* in Witches' broom disease in cacao. *Fungal Genet Biol* 49:922–932.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.09.001>
- Ducke A (1953) As espécies brasileiras do gênero *Theobroma* L. *Bol Técnico do Inst Agrônômico do Norte* 20: 1-25
- Ducke A (1946) Plantas de cultura precolombiana na Amazônia brasileira. Notas sobre as espécies ou formas espontâneas que supostamente lhes teriam dado origem. *Bol Técnico do Inst Agrônômico do Norte* 8:1–25
- Evans HC (1980) Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. *Trans Br Mycol Soc* 74:515–523.
[https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(80\)80051-9](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(80)80051-9)
- Falcão LL, Silva-Werneck JO, Albuquerque PSB, et al (2022) Comparative transcriptomics of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) offers insights into the early defense mechanism to *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease. *J Plant Interact* 17:991–1005.
<https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2144650>
- Garcia O, Macedo JAN, Tibúrcio R, et al (2007) Characterization of necrosis and

- ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. *Mycol Res.*
<https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.01.017>
- Alves RM, Chaves SFS, Negrão VML (2022) Viabilidade técnica do uso de *Swietenia macrophylla* e *Theobroma grandiflorum* em sistema agroflorestal. Technical feasibility of the use of *Swietenia macrophylla* and *Theobroma*. *Ciência Florestal* 32(2): 617-636, <https://doi.org/10.5902/1980509843268> 617–636
- Jean-Marie E, Jiang W, Bereau D, Robinson JC (2022) *Theobroma cacao* and *Theobroma grandiflorum*: Botany, Composition and Pharmacological Activities of Pods and Seeds. *Foods* 11:. <https://doi.org/10.3390/foods11243966>
- Kilaru A, Bailey BA, Hasenstein KH (2007) *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. *FEMS Microbiol Lett* 274:238–244. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00837.x>
- Kilaru A, Hasenstein KH (2005) Development and pathogenicity of the fungus *Crinipellis perniciosa* on interaction with cacao leaves. *Phytopathology* 95:101–107. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0101>
- Kuhn DN, Figueira A, Lopes U, et al (2010) Evaluating *Theobroma grandiflorum* for comparative genomic studies with *Theobroma cacao*. *Tree Genet Genomes* 6:783–792. <https://doi.org/10.1007/S11295-010-0291-0>
- Litholdo CG, Leal GA, Albuquerque PSB, Figueira A (2015) Differential expression of jasmonate biosynthesis genes in cacao genotypes contrasting for resistance against *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Cell Rep* 34:1747–1759.
<https://doi.org/10.1007/s00299-015-1821-x>
- Machado C (2022) Aproveitamento integral do cupuaçu na área de panificação Integral use of cupuassu in baking Uso integral del cupuaçu en el área de panadería. 2022:1–15
- Mares JH, Gramacho KP, Santana JO, et al (2020) Hydrosoluble phylloplane components of *Theobroma cacao* modulate the metabolism of *Moniliophthora perniciosa* spores during germination. *Fungal Biol* 124:73–81.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.11.008>
- Meinhardt LW, Rincones J, Bailey BA, et al (2008) *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: What's new from this old foe? *Mol Plant Pathol* 9:577–588. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00496.x>

- Mondego JM, Carazzolle MF, Costa GG, et al (2008) A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. BMC Genomics 9:548. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-548>
- Mournet P, de Albuquerque PSB, Alves RM, et al (2020) A reference high-density genetic map of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng) and QTL detection for resistance to witches' broom disease (*Moniliophthora perniciosa*). Tree Genet Genomes 16:89. <https://doi.org/10.1007/s11295-020-01479-3>
- Niu YF, Ni SB, Liu J (2019) The complete chloroplast genome of *Theobroma grandiflorum*, an important tropical crop. Mitochondrial DNA Part B Resour 4:4157–4158. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1693291>
- Pereira ALF, Feitosa WSC, Abreu VKG, et al (2017) Impact of fermentation conditions on the quality and sensory properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) beverage. Food Res Int 100:603–611. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.055>
- Pugliese AG, Tomas-Barberan FA, Truchado P, Genovese MI (2013) Flavonoids, Proanthocyanidins, Vitamin C, and Antioxidant Activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) Pulp and Seeds. J Agric Food Chem 61:2720–2728. <https://doi.org/10.1021/JF304349U>
- Purdy L, Schmidt R (1996) STATUS OF CACAO WITCHES' BROOM: Biology, Epidemiology, and Management. Annu Rev Phytopathol 34:573–594. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.573>
- Ramos S de NM, Glezer JW, Garcia A de O, et al (2022) Cupuassu from bean to bar: Sensory and hedonic characterization of a chocolate-like product. Food Res Int 155:. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111039>
- Rocha J, Laps RR, Machado CG, Campiolo S (2019) The conservation value of cacao agroforestry for bird functional diversity in tropical agricultural landscapes. Ecol Evol 9:7903–7913. <https://doi.org/10.1002/ece3.5021>
- Silva RJS, Alves RM, Peres Gramacho K, et al (2020) Involvement of structurally distinct cupuassu chitinases and osmotin in plant resistance to the fungus *Moniliophthora perniciosa*. Plant Physiol Biochem 148:142–151. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.009>
- Santos LF dos, Fregapani RM, Falcão LL, et al (2016a) First microsatellite markers developed from cupuassu ESTs: Application in diversity analysis and cross-species transferability to cacao. PLoS One 11:1–19.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151074>
- Santos LF dos, Silva RJS, Falcão LL, et al (2022) Cupuassu (*Theobroma grandiflorum* [Willd. ex Sprengel] Schumann) Fruit Development: Key Genes Involved in Primary Metabolism and Stress Response. *Agronomy* 12:763. <https://doi.org/10.3390/agronomy12040763>
- Santos LF Dos, Silva RJS, Oliveira Jordão Do Amaral D, et al (2016b) Selection of reference genes for expression study in pulp and seeds of *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum. *PLoS One* 11:e.0160646. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160646>
- Saraiva EC, Santos D, César R, et al (2004) Aproveitamento da casca do cupuaçuzeiro para a produção de energia. *5 Enc Energ Meio Rural* 8
- Sena K, Alemanno L, Gramacho KP (2014) The infection process of *Moniliophthora perniciosa* in cacao. *Plant Pathol* 63:1272–1281. <https://doi.org/10.1111/ppa.12224>
- Silva GM da, Moreira RJ de A, Cândido JE, et al (2021) Obtenção De Farinhas Das Cascas De Cupuaçu E Pitomba: Análise Bromatológica E Fitoquímica. *Extensão Rural Práticas e Pesqui Para o Fortalecimento da Agric Fam - Vol 1* 431–449. <https://doi.org/10.37885/210102768>
- Silva Junior JF da, Souza FVD, Padua JG (2019) A arca de Noé das frutosa brasileiras
- Silva S, Midlej DV, Luz EDMN, Almeida OC, et al (2002) Redescrição da sintomatologia causada por *Crinipellis perniciosa* em cacauzeiro. *Agrotrópica* 14:12
- Souza MAGC, Alves RM, Souza G de (2017) *Theobroma grandiflorum*. In: Burle, MLF, Faleiro FG *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), p 23
- Teixeira PJPL, De Toledo Thomazella DP, Reis O, et al (2014) High-Resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Cell* 26:4245–4269. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.130807>
- Teixeira PJPL, Thomazella DP de T, Pereira GAG (2015) Time for Chocolate: Current understanding and new perspectives on Cacao witches' bBroom diseaser research. *PLoS Pathog* 11:. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005130>
- Thomazella DPT, Teixeira PJPL, Oliveira HC, et al (2012) The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. *New Phytol* 194:1025–1034. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04119.x>

- Wade ASI, Asase A, Hadley P, et al (2010) Management strategies for maximizing carbon storage and tree species diversity in cocoa-growing landscapes. *Agric Ecosyst Environ* 138:324–334. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2010.06.007>
- Wemheuer F, Berkelmann D, Wemheuer B, et al (2020) Agroforestry management systems drive the composition, diversity, and function of fungal and bacterial endophyte communities in *Theobroma cacao* leaves. *Microorganisms* <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030405>
- Zaparoli G, Cabrera OG, Medrano FJ, et al (2009) Identification of a second family of genes in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease in cacao, encoding necrosis-inducing proteins similar to cerato-platanins. *Mycol Res* 113:61–72. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.08.004>

CAPÍTULO I

Transcritômica comparativa do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) oferece informações sobre os mecanismos iniciais de defesa contra *Moniliophthora perniciosa*, o agente causal da vassoura de bruxa

Este capítulo apresenta a parte do trabalho de tese publicado em 2022, na revista "Journal of Plant Interaction".

Falcão LL, et al (2022) Comparative transcriptomics of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) offers insights into the early defense mechanism to *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease. J Plant Interact 17:991–1005. <https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2144650>

RESUMO

Theobroma grandiflorum é uma fruteira nativa da região amazônica e parente do cacau (*T. cacao*). Possui um enorme potencial econômico devido aos seus múltiplos usos nas indústrias alimentícia e cosmética. A cultura do cupuaçu é gravemente afetada pelo *Moniliophthora perniciosa*, fungo causador da vassoura de bruxa (VB), tanto no cupuaçu quanto no cacau. O conhecimento desse fitopatossistema é fundamental para propor estratégias de controle e mitigação dos danos causados pela VB a essas culturas. Para fornecer informações sobre a resistência do cupuaçu a *M. perniciosa*, os perfis transcritômicos de um genótipo resistente (clone 174) e um suscetível (clone 1074) foram analisados usando a tecnologia RNA-seq. Neste estudo, apresentamos a análise do transcriptoma de ambos os genótipos desafiados com *M. perniciosa*, em diferentes tempos de exposição ao patógeno, na fase inicial da infecção. Um total de 21.441 unigenes e 440 genes diferencialmente expressos (DEGs) foram identificados entre as diferentes condições. A análise de diferença intrínseca entre os genótipos mostrou 301 DEGs. A alteração da expressão gênica foi observada mais precocemente no genótipo suscetível 24 horas após a inoculação (hai). No genótipo resistente, a alteração foi mais acentuada às 48 hai. Este conjunto de dados permitiu a identificação de genes potencialmente envolvidos nos mecanismos de defesa, entre eles, receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), fatores de transcrição, proteínas relacionadas à patogênese (PRs), proteínas relacionadas ao remodelamento da parede celular, genes relacionados ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e vias de terpenos. A análise da assinatura dos fitohormônios, em cada condição, revelou uma influência hormonal significativa nas respostas dos genótipos. Os genótipos diferiram principalmente em relação às respostas de auxina, citocinina, ácido salicílico e brassinosteróides. Este é o primeiro estudo de transcriptoma em larga escala de *T. grandiflorum*, que além de conhecimento sobre o processo de resistência, gerou uma lista de genes potencialmente importantes neste processo. O banco de dados gerados pelo sequenciamento e o conhecimento gerado sobre os mecanismos de defesa nos estágios iniciais da interação Cupuaçu- *M. perniciosa* são recursos valiosos para análises mais profundas, fornecendo maiores esclarecimentos sobre os mecanismos envolvidos na resistência e suscetibilidade em cupuaçuzeiros, subsidiando o desenvolvimento de seus programas de melhoramento e de estratégias de controle de VB.

Comparative transcriptomics of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) offers insights into the early defense mechanism to *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease

Author

Falcão, Loeni Lüdke; Silva-Werneck, Joseilde Oliveira; Albuquerque, Paulo Sergio Bevilaqua; Alves, Rafael Moyses; Grynberg, Priscila; Togawa, Roberto Coiti; Costa, Marcos Mota do Carmo; Brígido, Marcelo de Macedo; Marcellino, Lucilia Helena

ABSTRACT

A Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) is a fruit tree native to the Amazon region, presenting high social and economic value. Besides, owing to its suitability for agroforestry cultivation, cupuassu is useful for the conservation of the Amazon Forest. Cupuassu plantations are severely affected by *Moniliophthora perniciosa*. Thus, to gain insights into resistance against *M. perniciosa*, transcriptomes of susceptible (SG) and resistant (RG) genotypes of cupuassu were analyzed at the early stage of infection using RNA sequencing. A total of 21,441 unigenes were identified, and differentially expressed genes were detected in intra- (440) and inter-genotype (301) analyses. Gene expression was altered at 24 h after inoculation (HAI) in SG. This alteration was prominent at 48 HAI in RG. These datasets allowed the identification of genes potentially involved in defense mechanisms. Phytohormone signature analysis revealed a significant effect of hormones on genotype responses. The present study is the first large-scale transcriptomic analysis of cupuassu.

Keywords: Differential gene expression, functional genomics, plant–pathogen interaction, RNA-Seq, transcriptome

INTRODUCTION

Cupuassu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) is a fruit tree native to the Amazon region and is closely related to the cacao tree (*Theobroma cacao* L.). Both species are diploid ($2n = 20$) (Kuhn et al. 2010; Silva et al. 2017) and belong to the Malvaceae family. Cupuassu presents immense economic potential due to multiple uses of its pulp and almonds in the food and cosmetic industries. Several products are manufactured from pulp, such as juices, ice cream, liqueurs, jellies, sweets, and cosmetics (Calzavara et al. 1984; de Nazaré et al. 1990; Alves et al. 2007; Salgado et al. 2011). Additionally, in almonds, which represent 15% of fruit weight, approximately 60% of dry weight is composed of an easily digestible thin fat, which primarily constitutes oleic and stearic acids (Vasconcelos et al. 1975; Lannes et al. 2003). From this thin fat, a product very similar to chocolate, named cupulate, can be obtained (de Nazaré et al. 1990). Furthermore, these trees are suitable for cultivation in sustainable agroforestry systems, highlighting their socioeconomic and environmental significance to the Amazon region (Reisdorff et al. 2000; Alves et al. 2014, 2021).

However, cupuassu plantations are severely affected by witches' broom disease (WBD), a major disease of this crop and a limiting factor for fruit production (Alves et al. 2014). In both cacao and cupuassu, WBD is caused by the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora 2006 (Aime and Phillips-Mora 2005). It is a hemibiotrophic fungus with biotrophic and saprotrophic phases (Meinhardt et al. 2008). Initially, the fungus attacks the plant meristematic tissues (shoots, young pods and flower cushions), growing in intercellular spaces as a mononuclear mycelium of the biotrophic phase, and no apparent symptoms are observed up to 20 days in cacao (Silva et al. 2002; Sena et al. 2014). Then, plant physiological and morphological alterations occur, such as loss of apical dominance and abnormal bud proliferation, resulting in swollen shoots with many branches (green broom). As the disease progresses, the fungus shifts to its saprotrophic phase, with a dikaryotic mycelium. At this stage, *M. perniciosa* develops intracellularly, leaves on broom begin to necrose, followed by necrosis of its stems, resulting in their death (dry broom) (Purdy and Schmidt 1996; Meinhardt et al. 2008; Sena et al. 2014).

Cupuassu with different resistance levels are available, but they are primary clones collected from wild parents in the Amazon region, Brazil. Obtaining plants that combine resistance and productivity is a challenge for the cupuassu breeding program. However,

the current knowledge of the *T. grandiflorum* molecular genetics and the molecular basis of its interaction with *M. perniciosa* is incipient, hampering the development of the breeding program.

Meanwhile, for *T. cacao*, genomic (Argout et al. 2011; Motamayor et al. 2013), transcriptomic, and proteomic data are available (Gesteira et al. 2007; Leal et al. 2007; Argout et al. 2008; da Hora Junior et al. 2012; Britto et al. 2013; dos Santos et al. 2020) supporting its breeding program. The resistant genotype of cacao presents an intense response produced by the expression of transcripts associated with signaling processes (e.g., receptor proteins) at the early stages of infection (48–120 h), which affects fungal colonization (Leal et al. 2007). Furthermore, disease resistance is associated with strong production of elicitors and reactive oxygen species (ROS) at the beginning of interaction, as well as, posterior signal transduction and ROS detoxification (da Hora Junior et al. 2012; dos Santos et al. 2020). In susceptible plants, infected tissues undergo massive metabolic reprogramming, characteristic carbon deprivation signature, downregulation of photosynthesis-related genes, and upregulation of genes associated with plant defense responses, which fail to prevent the disease (Leal et al. 2007; da Hora Junior et al. 2012; Teixeira et al. 2014; Royaert et al. 2016; dos Santos et al. 2020), as well as accumulation and degradation of calcium oxalate crystals, which are involved in plant cell death (Ceita et al. 2007). It is also reported that phytohormones play an important role in WBD development. The pathogenicity of *M. perniciosa* is associated with the increase of auxin (IAA) and salicylic acid (SA) during colonization of cacao leaves (Kilaru et al. 2007). In addition, Costa and collaborators (2021) suggest that *M. perniciosa* produces cytokinins that might interfere with host cytokinin biosynthesis, contributing to the disease development (Costa et al. 2021). Furthermore, phytohormone signature analysis reveals an increase in the levels of auxin, gibberellin, and ethylene in infected tissues of susceptible cacao plants (Teixeira et al. 2014).

Although these findings have shed light on the molecular basis of disease development in cacao and, consequently, in the *Theobroma* genus, specific data must be generated for *T. grandiflorum*. Recently, transcriptomic data from cupuassu seeds have allowed the development of expressed sequence tag (EST) microsatellite markers (Santos et al. 2016a), selection of reference genes for expression (Santos et al. 2016b), and analyses of specific cupuassu chitinases and their potential involvement in plant resistance to *M. perniciosa* (Santana Silva et al. 2020). Additionally, the first high-density

genetic map of *T. grandiflorum* was published, and a quantitative trait locus (QTL) on chromosome 6 was identified to be linked with resistance to *M. perniciosa* (Mournet et al. 2020).

In the present study, aiming to increase the molecular knowledge about *T. grandiflorum* and its interaction with *M. perniciosa*, a large-scale RNA sequencing (RNA-Seq) was performed. These data allowed a functional genomic analysis of this plant-pathogen interaction at its initial asymptomatic phase. The differentially expressed genes (DEGs) were identified at the first two days after inoculation, aiming to detect early responses in resistant and susceptible cupuassu genotypes, as well as the intrinsic differences between them. The phytohormone signature and the enrichment of ontology terms were analyzed to better understand the differences in genotypes molecular responses to the presence of the fungus. Furthermore, the DEGs belonging to categories of genes known to be part of the resistance mechanism, such as transcription factors (TFs), pattern-recognition receptors (PRRs) and pathogenesis-related proteins (PRs) were analyzed in detail.

MATERIALS AND METHODS

Biological material and inoculation

Clones of *T. grandiflorum*, one resistant and one susceptible to *M. perniciosa*, were grown in the field for approximately 3 years at the experimental campus of José Haroldo Genetic Resources Station (ERJOH) of CEPLAC - Executive Commission of the Cacao Farming Plan (Marituba, PA, Brazil), GPS coordinates 1°22'S 48°17'W. These were primary clones collected from wild parents in the Amazon State (Brazil). Clone 174/cultivar BRS Coari (resistant genotype - RG) was collected from the Coari County (AM) and clone 1074 (susceptible genotype - SG) from the Itacoatiara County (AM). *M. perniciosa* basidiospores were obtained from basidiocarps developed on brooms of cupuassu trees at ERJOH. Basidiospores were collected in 16% glycerol in 0.01 M 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES), pH 6.1 (Frias et al. 1995; Leal et al. 2010), and preserved in liquid nitrogen, in the Phytopathology Laboratory of ERJOH, until further use.

For cupuassu inoculation, plants have been previously pruned to induce new profusely branched shoots. Selected apical shoots were inoculated with 30 μL of *M. pernicioso* basidiospore suspension (10^5 spores mL^{-1}) (Surujdeo-Maharaj et al. 2003), with germination rate higher than 95%, assessed by observation under a reverse-phase optical microscope, immediately before inoculation. The inoculated apical shoots were covered in plastic bags for 24 h to ensure a humid environment. This artificial inoculation method has already been used successfully in cupuassu (Mournet et al. 2020). Afterwards, apical shoots were collected, trimmed to remove leaves and petioles, and the tip (0.5 cm) was cut and immediately immersed in RNAlater[®] solution (InvitrogenTM, Carlsbad, CA, USA). Each treatment (non-inoculated, 24 and 48 HAI), composed of five apical shoots, was performed with three biological replicates. The experiment was carried out once, in a completely randomized design. Therefore, the experiment comprised 2 genotypes (RG x SG) * 3 treatments (non-inoculated, 24 HAI, 48 HAI) * 3 replicates each, generating 18 samples, further used to construct the cDNA libraries. Non-inoculated shoots were collected on the same day of 24 HAI samples. The experiment was carried out in a dry season to prevent natural fungal sporulation (March 2016, at temperatures varying from 23°C to 29°C and under photoperiod of 12h/12h, with total precipitation of 480 mm in that month). The investigation was approved by the Brazilian Genetic Heritage Management Council (CGEN) (SISGEN registration number AD93167).

RNA isolation

RNA isolation method was adapted from the one described for pine trees (Chang et al. 1993). Apical shoot samples were ground in liquid nitrogen. Next, 1 mL of CTAB buffer (2% CTAB, 4% PVP40, 100 mM Tris-HCl [pH 8], 25 mM EDTA [pH 8], 2 M NaCl, 2% β -mercaptoethanol) was preheated to 65°C and then added to 100 mg of macerated material. The samples were vortexed for 10 min, maintained at 65°C for 15 min, and then vortexed again for 1 min every 5 minutes. Then, 0.8 mL of chloroform: isoamyl alcohol solution [24:1 (v/v)] was added to each sample, followed by vortexing for 1 min and centrifugation at 12,000 $\times g$ and 4°C for 5 min. The aqueous phase was collected, and the previous step was repeated. Total RNA was precipitated by adding lithium chloride at a final concentration of 2 M and incubating for 2 h at -20°C. Following centrifugation at 12,000 $\times g$ and 4°C for 15 min, the precipitated pellets were washed with 70% ethanol and resuspended in 20 μL of DEPC-treated H_2O . The samples were then

treated with DNase I (Fermentas, 1 U·mg⁻¹ of RNA) and purified using the Reliaprep kitTM (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions.

The quantity and quality of RNA samples were assessed using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Finally, 1 µg of RNA, stabilized in an RNAsable tube (Biomatrica, San Diego, CA, USA), was sent for mRNA sequencing to an NGS service provider.

Library construction, sequencing, annotation, and data processing

Eighteen cDNA libraries were constructed from cupuassu apical shoots (three replicates for each of the three treatments [non-inoculated, 24 HAI, 48 HAI] and two genotypes [RG and SG]). The three treatments were labeled RT and ST for non-inoculated controls, R24 and S24 for 24 HAI, and R48 and S48 for 48 HAI. Libraries were prepared and sequenced at the Roy J. Carver Biotechnology Center of the University of Illinois at Urbana-Champaign (Illinois, USA). Each library was paired-end sequenced on a HiSeq 2500 sequencer (Illumina platform) at 100 bp size, generating approximately 20 million reads per library. The data (Fastq) were analyzed at the Bioinformatics Laboratory of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology. The reads were filtered based on positional quality over a flow cell using the FilterByTile program of the BMAP package (<https://sourceforge.net/projects/bbmap/>). Quality reads were mapped to the *T. cacao* V.2 genome using a STAR software package (Dobin et al. 2013), followed by HTSeq-count (Anders et al. 2015). Transcriptome completeness was assessed using the BUSCO software after merging STAR bam files with PICARD and extracting transcripts with Trinity.

The raw number of mapped reads calculated per sample was used as the input for the R package NOISeq (Tarazona et al. 2015), applied to produce normalized values accounting for sample-specific effects and to obtain the inference of differential gene expression.

Intra- and inter-genotype comparisons were performed. For intra-genotype analysis, inoculated samples (24 HAI and 48 HAI) of each genotype were compared to their respective non-inoculated control samples (RT and ST). For inter-genotype analysis (SG × RG), the samples were compared to identify intrinsic differences between the control, 24 HAI, and 48 HAI. Genes were considered differentially expressed if the base

2 logarithm of fold change (\log_2FC) was >2 or <-2 and the probability value was >0.95 . The gff file from *T. cacao* genome [Belizean Criollo genotype (B97-61/B2), version 2, available at <https://cocoa-genome-hub.southgreen.fr>] was used for transcript annotation.

A heatmap of differentially expressed genes (DEGs) from each genotype under different treatments was generated based on \log_2FC values using the ClustVis web tool (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>).

Gene ontology (GO) annotation and enrichment analysis

GO enrichment hypergeometric analysis of DEGs was performed using the FUNC software following PFAM and GO term annotation. Terms that showed significant enrichment ($FDR > 0.05$) were considered for sampling frequency.

The dataset is deposited in the NCBI Sequence Read Archive (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/>) under accession number (the deposit is in process).

Phytohormone signature analysis

The HORMONOMETER program (<https://hormonometer.weizmann.ac.il/>) (Volodarsky et al. 2009) was used to compare *T. grandiflorum* gene expression in response to *M. perniciosa* to *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to exogenous application of phytohormones. *T. grandiflorum* genes orthologous to *Arabidopsis* genes were selected from using bidirectional BLAST analyses. Gene pairs were considered orthologous if bidirectional best hit yielded an e-value $\leq 1e-5$ in both directions.

Experimental validation of differential expression data using qRT-PCR

qRT-PCR (Applied Biosystems) was performed using SYBR Green I PCR Master Mix (Applied Biosystems) on the ABI 7900 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA). Primers used in the reactions are listed in Table S1 (Supplemental Material). The housekeeping gene malate dehydrogenase of *T. grandiflorum* was used to normalize the expression data, as previously described (Santos et al. 2016b). The formation of primer dimers and multiple products was controlled using melting-curve analysis. Fold changes in the expression of selected genes were calculated as Log10 relative quantity (RQ) values using the Pfaffl $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Pfaffl 2001).

RESULTS

***T. grandiflorum* transcriptome assembly**

Transcriptomic data for *T. grandiflorum* were obtained through Illumina sequencing, and ~20 million raw reads were generated with a read length of 198 bp paired ends. The number of input reads varied between 8,608,976 and 21,222,319, and 81–87% of these were uniquely mapped. Around 15% reads were unmapped or mapped to multiple loci were (Table S2, Supplemental Material).

A total of 21,441 unigenes were identified. After applying a filter for count (cut-off = 10 reads), the number of transcripts was reduced to 17,413, which were then used for differential gene expression analysis. Moreover, 75% of cupuassu protein sequences shared over 94% similarity with cacao sequences.

BUSCO analysis of *T. grandiflorum* transcriptome assembly revealed a completeness score of 93.5%.

Differential gene expression analysis

To evaluate the pattern of gene expression at the initial stages of response to *M. pernicioso* infection (24 and 48 HAI) in SG and RG, gene expression under each condition (genotype and time of inoculation) was analyzed using the R package NOISeq, and the DEGs were plotted on a heatmap (Fig. 1A). A total of 440 DEGs were identified among the different conditions. Note that each genotype analysis used its own non-inoculated library as the control (ST vs S24, ST vs S48, RT vs R24, and RT vs R48).

Furthermore, inter-genotype analysis was performed to assess the intrinsic differences of the genotypes. In this case, each analysis compared both genotypes under each treatment (ST vs RT, S24 vs R24, and S48 vs R48). A total of 301 DEGs were identified (Fig. 1E, 1F).

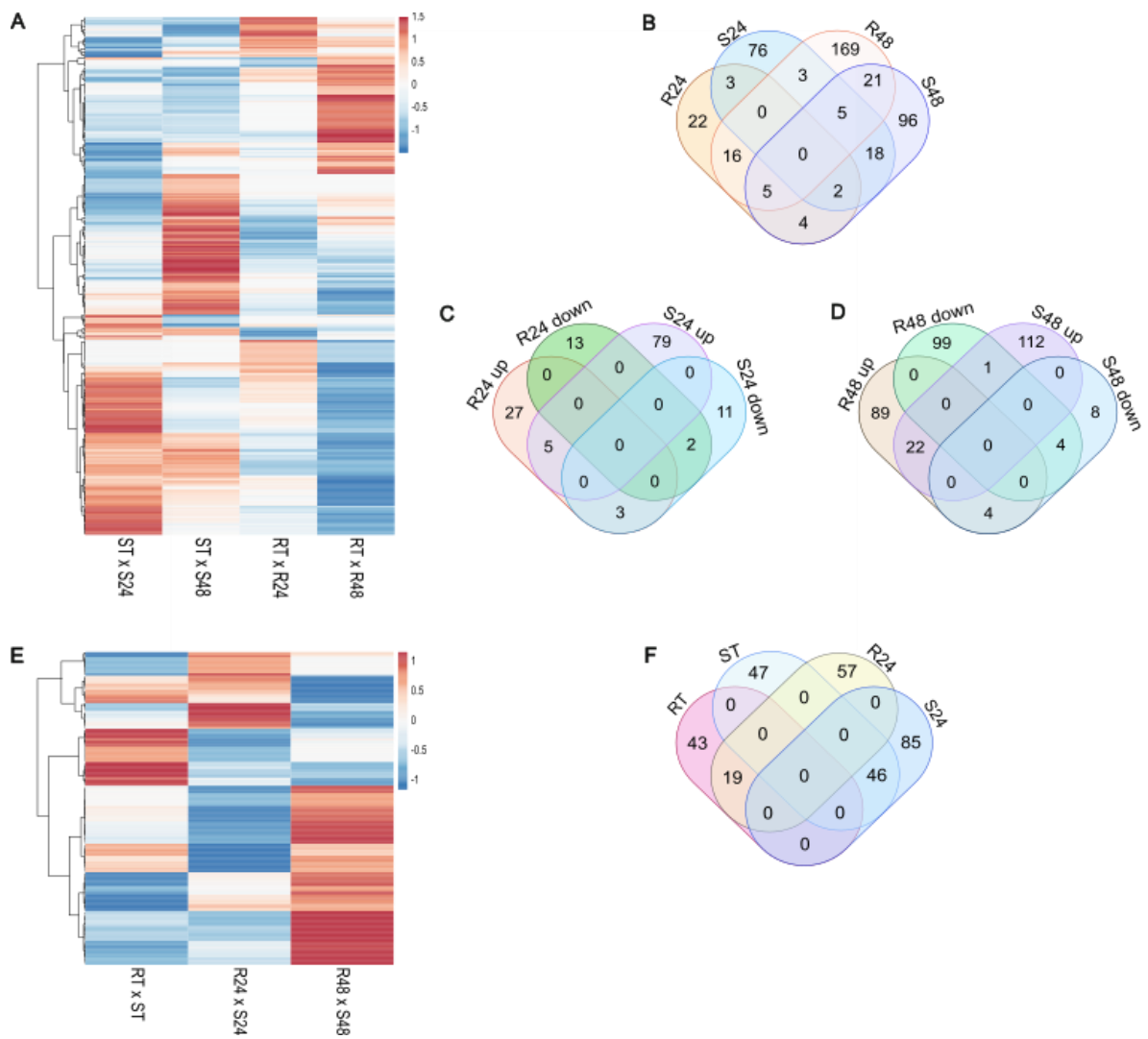


Figure 1. Differentially expressed genes (DEGs) in *Theobroma grandiflorum* challenged with *Moniliophthora perniciosa*. A) Heatmap of 440 DEGs from intra-genotype analysis. The color scale presents unit variance, with down- and upregulated genes under different conditions indicated in blue and red, respectively. B) Venn diagram of DEGs (intra-genotype analysis). C and D) DEGs at 24 and 48 HAI, respectively, discriminating up- and down-regulated genes. E) Heatmap of 301 DEGs from inter-genotypes analysis. Genes with higher expression levels in the susceptible genotype are indicated in blue, while those with higher expression levels in the resistant genotype are indicated in red. F) Venn diagram of DEGs (inter-genotypes analysis). R = resistant, S = susceptible, RT and ST = non-inoculated controls, R24 and S24 = 24 HAI, R48 and S48 = 48 HAI.

A markedly different response pattern between the two genotypes was observed. The pattern of differential gene expression in RG was different from that in SG at 24 and 48 HAI. Both heatmap and Venn diagram (Fig. 1) revealed some noteworthy differences.

In intra-genotype analysis, genes were upregulated under four different conditions. However, the number of DEGs was greater in SG than in RG (84 for S24 vs 37 for R24 and 135 for S48 vs 115 for R48) (Fig. 1A, 1C, 1D; Table S3A; Supplemental Material). Most DEGs were differentially expressed under specific conditions (Fig. 1B). Under all conditions, the number of upregulated DEGs was greater than that of downregulated ones. However, the ratio of up- to downregulated (up/down) genes was higher in SG than in RG ($84/23 = 3.6$ for S24 vs $135/16 = 8.4$ for S48 and $37/15 = 2.5$ for R24 vs $115/104 = 1.1$ for R48). The number of downregulated genes was greater in R48 (104 DEGs) than in the other conditions (Fig. 1A, 1C, 1D). RG showed a significant increase in the number of DEGs from 52 at 24 HAI to 219 at 48 HAI, representing an increase of 167 DEGs. In SG, the change was less pronounced (107 to 151 DEGs), with an increment of only 44 DEGs (Fig. 1A, 1B).

In non-inoculated samples, intrinsic differences were observed between the genotypes (inter-genotype analysis), with most DEGs exhibiting higher expression levels in SG than in RG (ST = 93 and RT = 62). In inoculated samples, most DEGs at 24 HAI exhibited higher expression levels in SG than in RG (S24 = 131 and R24 = 76) (Fig. 1E, 1F; Table S3B; Supplemental Material). Meanwhile, at 48 HAI, only seven DEGs were identified (S48 = 1 and R48 = 6).

RNA-Seq data were validated using the RT-qPCR of selected DEGs. The results are shown in Fig. S1A (Supplemental Material). The differences in gene expression between the two genotypes at 24 and 48 hours after *M. perniciosa* inoculation were compatible with the results of RNA-Seq, with a Pearson's correlation coefficient (R^2) exceeding 0.8 (Fig. S1A, S1B).

To identify genes involved in disease resistance, DEGs in specific categories were analyzed: PRRs, TFs, PRs, phytohormone signatures, and gene ontology differential term enrichment.

Pattern-recognition receptors

A total of 393 PRRs comprising receptor-like proteins (RLPs) and receptor-like kinases (RLKs) were identified among the transcripts. Of these, only 13 were

differentially expressed in intra-genotype analysis, with seven genes being upregulated only in R48 [LRR-RLK-Ser/Thr At3g47570 (Tc03v2_g012190); RLK-Ser/Thr SD1-8 (Tc07v2_g005660); LRR-RLK-Ser/Thr GSO2 (Tc06v2_g001190); LRR-RLK-Ser/Thr At1g56130 (Tc06v2_g011030); G-type RLK-Ser/Thr SD1-7 (Tc07v2_g005670); Cys-rich RLK 25 (Tc10v2_g012610); G-type lectin S-RLK-Ser/Thr At4g27290 (Tc07v2_g005600)] (Fig. 2A, continuous ellipse). In SG, however, changes in the expression levels of PRRs were negligible.

The number of differentially expressed PRRs (21 genes) in inter-genotype analysis (Fig. 2B) was greater than that in intra-genotype analysis (13 genes) (Fig. 2A). The expression levels of some PRRs were higher in RG than in SG [LRR Ser/Thr-RLK At1g07650 (Tc06v2_g013330), Type Lectin Ser/Thr-RLK B120 (Tc06v2_g016810), G-type Lectin Ser/Thr-RLK At1g61370 (Tc06v2_g016820), G-type Lectin Ser/Thr-RLK At4g27290 (Tc06v2_g016870), Cys-rich RLK 25 (Tc06v2_g017430, Cys-rich RLK 26 (Tc06v2_g017440), RLP 12 (Tc07v2_g001860), RLP 12 (Tc07v2_g001910)], and this pattern remained unchanged same at 24 HAI (Fig. 2B, continuous ellipse). The expression levels of some genes were lower in RG, although their expression level increased in R48 (Fig. 2B, dashed ellipse).

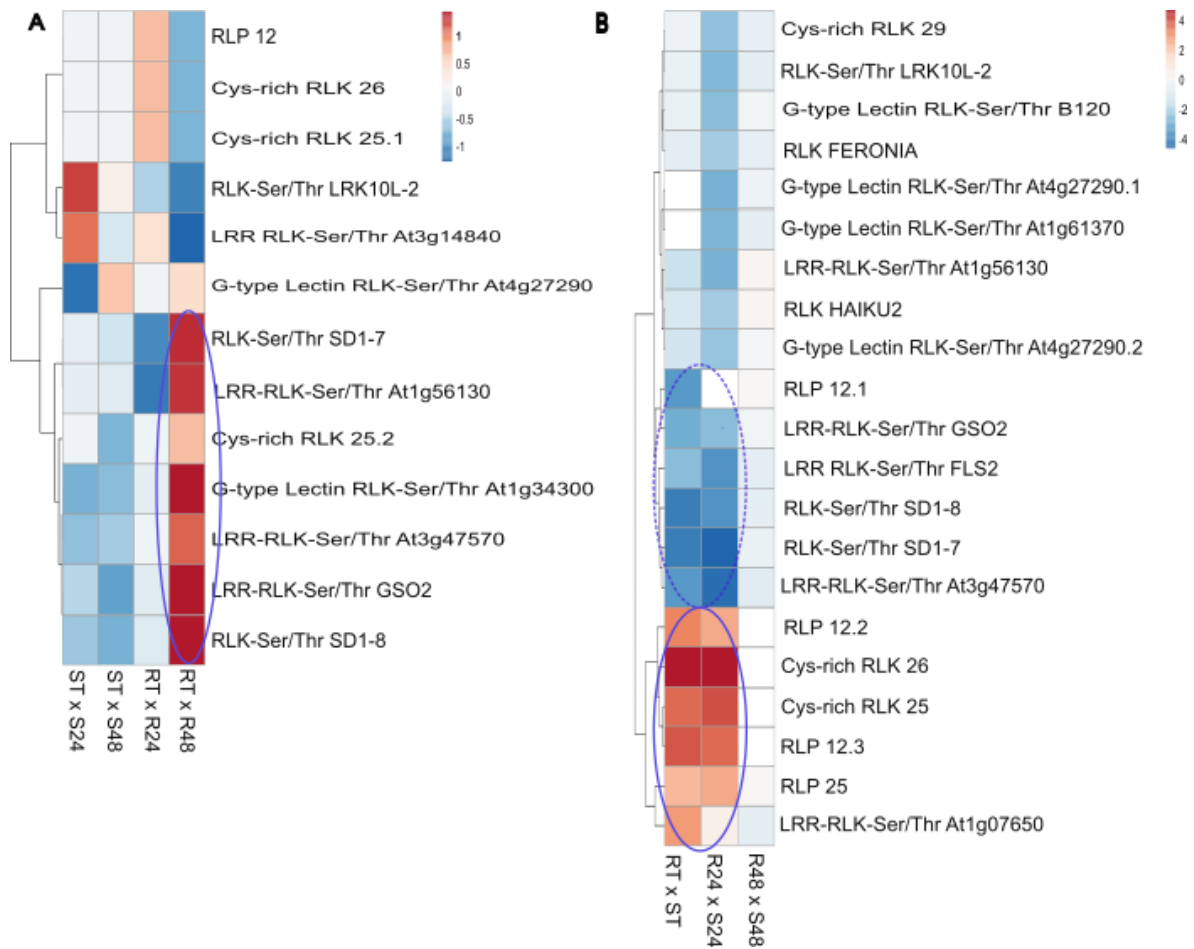


Figure 2. Differential expression profiles of pattern-recognition receptors (PRRs) genes during *Theobroma grandiflorum*–*Moniliophthora perniciosa* interaction. A) Heatmap of variation in PRRs expression in intra-genotype analysis. The color scale presents unit variance, with down- and upregulated genes under different conditions indicated in blue and red, respectively. B) Heatmap of variation in PRRs expression in inter-genotypes analysis. Gene with higher expression levels in SG are indicated in blue, while those with higher expression levels in RG are indicated in red. R = resistant, S = susceptible, RT and ST = non-inoculated controls, R24 and S24 = 24 HAI, R48 and S48 = 48 HAI.

Transcription factors

Among the 17,413 unigenes used for the evaluation of differential gene expression, 461 were TFs. Of these, 20 were DEGs, and majority of them belonged to three families: ethylene-responsive factors (ERFs) (7), WRKY TFs (4), and bHLH130 TFs (4).

In SG, the expression of most differentially expressed TFs increased at 24 HAI (Fig. 3A, continuous ellipse) but decreased at 48 HAI to the base level. In RG, the expression of differentially TFs remained unchanged at 24 HAI but decreased at 48 HAI. However, ethylene-responsive transcription factor 9 (ERF9), JUNGBRUNNEN 1 (JUB1), and MYB82 exhibited opposite trends, with increased expression in RG at 48 HAI (Fig. 3A, dashed ellipse).

Among the four WRKY transcription factors identified, the putative WRKY72 TF (Tc02v2_g030330) (Fig. 3A, arrow) exhibited a different behavior from the others. As such, WRKY72 was downregulated in S24 and upregulated in S48, whereas the other three TFs, namely WRKY60 (Tc09v2_g001440), WRKY23 (Tc01v2_g026410), and WRKY40 (tc06v2_g003310), showed opposite trends.

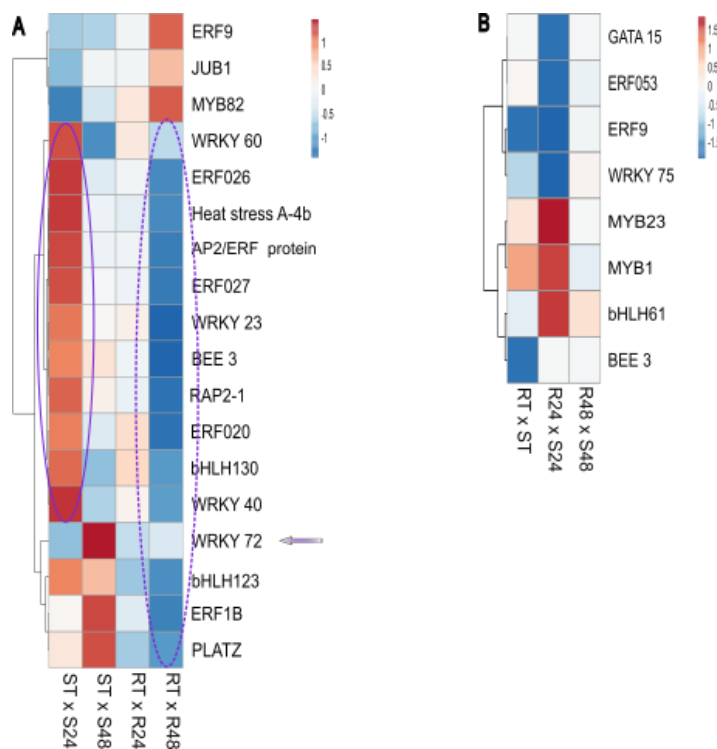


Figure 3. Differential expression profile of transcription factors (TFs) during *Theobroma grandiflorum*–*Moniliophthora perniciosa* interaction. A) Heatmap of variation in TFs expression in intra-genotype analysis. The color scale presents unit variance, with down- and upregulated genes under different conditions indicated in blue and red, respectively. B) Heatmap of variation in TFs expression in inter-genotypes analysis. Genes with higher expression levels in SG are indicated in blue, while those with higher expression levels

in RG are indicated in red. R = resistant, S = susceptible, RT and ST = non-inoculated controls, R24 and S24 = 24 HAI, R48 and S48 = 48 HAI.

In inter-genotype analysis, eight differentially expressed TFs were identified. Specifically, ERF9 and BEE3 showed higher expression levels in non-inoculated SG (RT vs ST). In addition, seven differentially expressed TFs were detected between R24 and S24 (Fig. 3B).

Additionally, in R48, ERF9 expression level was nearly 100 times higher than that in RT and R24 (Fig. 3A). However, in SG, ERF9 was already expressed at this level in non-inoculated controls (ST) and showed no change afterward (Fig. 3B).

Pathogenesis related proteins

A total of 288 PR-like genes were identified in *T. grandiflorum*. Of these, 37 were differentially expressed in intra-genotype analysis. Several PRs presented opposite expression trends depending on the genotype. For instance, some PRs were up-regulated in S48 (Fig. 4A, dashed ellipse) but down-regulated in R48, whereas some others were exclusively upregulated in R48 (Fig. 4A, continuous ellipse).

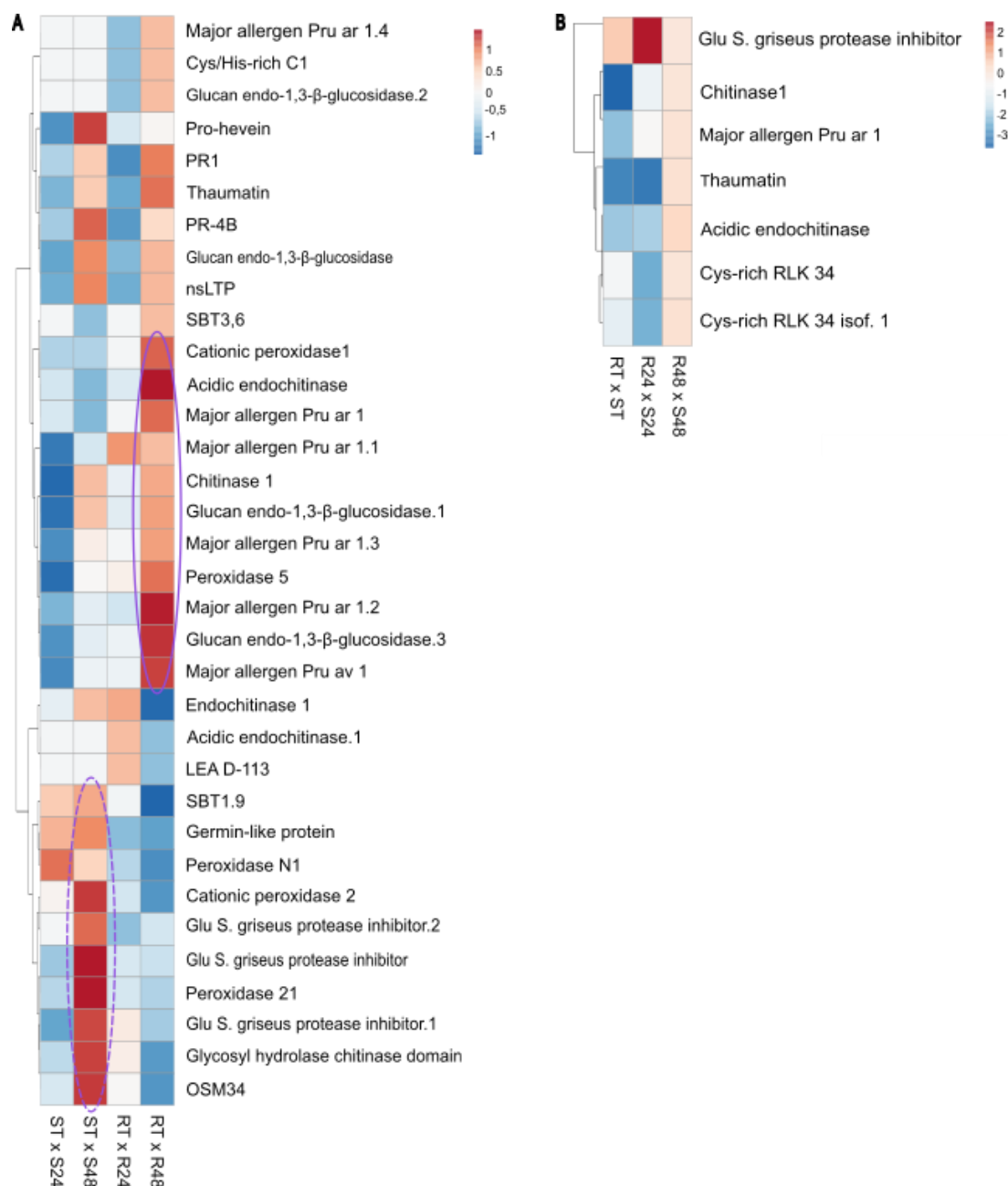


Figure 4. Differential expression profile of pathogenesis related (PR) genes in *Theobroma grandiflorum*–*Moniliophthora perniciosa* interaction. A) Heatmap of variation in PRs expression in intra-genotype analysis. The color scale presents unit variance, with down- and upregulated genes under different conditions indicated in blue and red, respectively. B) Heatmap of variation in PRs expression in inter-genotypes analysis. Genes with higher expression levels in SG are indicated in blue, while those with higher expression levels in RG are indicated in red. R = resistant, S = susceptible, RT and ST = non-inoculated controls, R24 and S24 = 24 HAI, R48 and S48 = 48 HAI.

In inter-genotype analysis, the expression of four PR-like genes, namely chitinase 1, thaumatin-like protein, major allergen Pru ar 1, and acidic endochitinase, was higher in ST than in RT (Fig. 4B). However, the expression levels of these PRs in R48 increased to values similar to those in S48.

Phytohormone signatures

To evaluate the correlation between transcriptional responses of *T. grandiflorum* to *M. perniciosa* infection and transcriptional responses to phytohormones, the HORMONOMETER program was used. Hormonometer correlates the query transcriptome to *Arabidopsis* gene expression under different phytohormones treatment: jasmonic acid (JA), ethylene (ET), abscisic acid (ABA), auxin (IAA), gibberellic acid (GA), cytokinin (CK), brassinosteroids (BRs), and salicylic acid (SA) (Fig. 5).

The expression profile of S24 was strongly and positively correlated (index > 0.6) with the profile of *Arabidopsis* treated with MJ60 (derivative of JA), ABA180, and IAA30. In S48, the strength of correlation increased under treatment with SA180 but decreased under treatment with MJ30/60/180, ABA180, and IAA30/60/180 compared with that in S24. In contrast, the expression profile of R48 showed weak or no correlation with MJ and IAA but was correlated with ABA60/180 and SA180. Furthermore, the expression profile of R48 was positively correlated with Zeatin180 (cytokinin). Meanwhile, SG showed no correlation with Zeatin180 but showed a strong negative correlation with brassino30/60 and ACC30/60 (ethylene) (Fig. 5).

The proportion of SA/JA in R48 was higher than that in S48, with correlation index ratios of 0.6/0.2 and 0.8/0.4, respectively, indicating the favoring of SA over the JA pathway, which was more evident in R48.

ABA and GA showed antagonist behavior in both genotypes at 24 and 48 HAI.

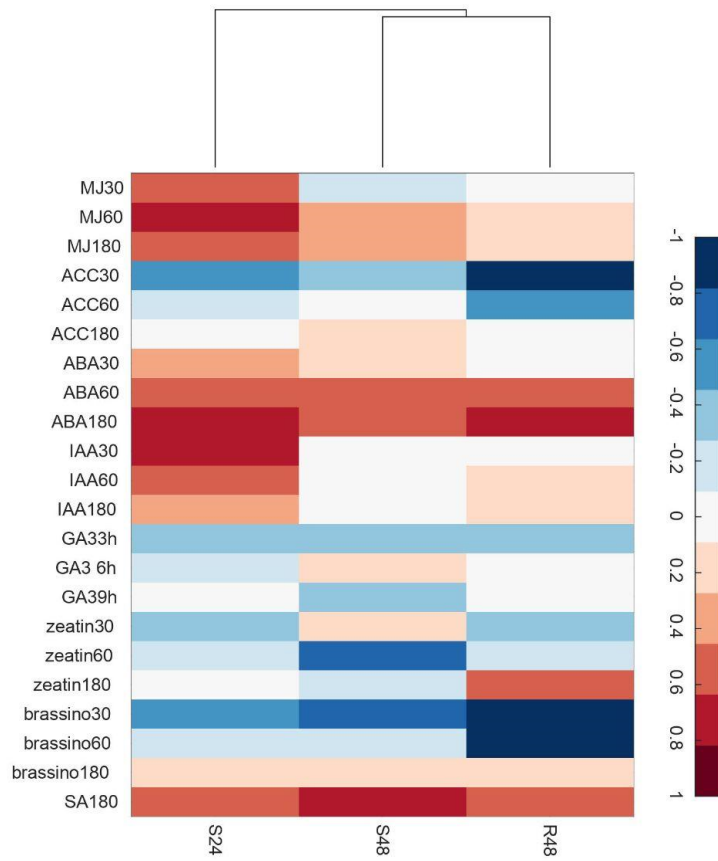


Figure 5. Clustergram of correlation between gene expression profiles in the *Theobroma grandiflorum*–*Moniliophthora perniciosa* interaction and *Arabidopsis thaliana* under different hormone treatments. Scale bar = indices of hormone action. Color code: red for positive, white for neutral, and blue for negative correlation. MJ = methyl jasmonate (derived from jasmonic acid, JA); ACC = 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ethylene); ABA = abscisic acid; IAA = indole-3-acetic acid (auxin); GA3 = gibberellic acid; zeatin (cytokinin); Brassino = brassinosteroids; SA = salicylic acid. Numbers following the hormone abbreviation indicate the time of treatment (30–180 min or 3–9 h). R = resistant, S = susceptible, S24 = 24 HAI, R48 and S48 = 48 HAI.

Since auxin is an important player in WBD, the behavior of small auxin-upregulated RNAs (*SAURs*)—a set of auxin-responsive genes—was examined. Some *SAURs* were upregulated in S24 and S48, whereas most were downregulated in R48 (Fig. 6).

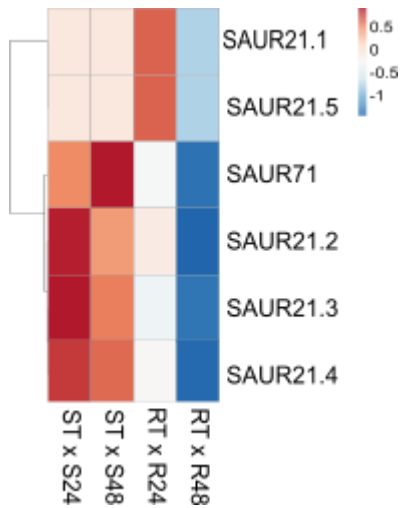


Figure 6. Expression profile of differentially expressed *SAUR* genes in the *Theobroma grandiflorum*–*Moniliophthora perniciosa* interaction. Heatmap of variation in *SAUR*s expression in intra-genotype analysis. The color scale presents unit variance, with down- and upregulated genes under different conditions indicated in blue and red, respectively. R = resistant, S = susceptible, RT and ST = non-inoculated controls, R24 and S24 = 24 HAI, R48 and S48 = 48 HAI.

GO enrichment analysis

To evaluate the pattern of gene expression at the initial stages of response to *M. perniciosa* infection, DEGs obtained using RNA-Seq were subjected to hypergeometric GO analysis.

The intra-genotype analysis revealed two enriched GO terms of upregulated DEGs in SG (terpene synthase activity and DNA-binding transcription factor activity) and only one enriched GO term of downregulated DEGs (heme binding) in RG at 24 HAI. Meanwhile, at 48 HAI, more GO terms of upregulated DEGs were enriched (18 terms), most of which were different between SG and RG (Fig. 7A).

Regarding responses to stimuli, for instance, the GO terms were related to response to biotic stimuli (enriched by major allergen Pru ar 1, PR-4B, and MLP-like protein 31 genes) in R48 and response to wounding (enriched by Glu *S. griseus* protease inhibitor gene) in S48.

Furthermore, RG and SG differed in terms of oxidoreductase activity (GO:0016491). For instance, more protein detoxification genes were upregulated in SG.

In R48, the most enriched GO term was peroxidase activity, which was not enriched in SG.

The GO term terpene synthase was enriched by the upregulated genes probable terpene synthase 9 (Tc02v2_g013900 and Tc02v2_g013910) and probable terpene synthase 6 (Tc07v2_g014440) in S24 and by the upregulated genes (3S,6E)-nerolidol synthase 2, chloroplastic/mitochondrial (Tc06v2_g017070), alpha-farnesene synthase (Tc06v2_g017120), (+)-delta-cadinene synthase isozyme XC14 (Tc07v2_g004970), and (+)-delta-cadinene synthase isozyme A (Tc07v2_g004990) in R48.

The GO term extracellular region was enriched by the upregulated genes expansin B1, PR1, xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 2 (XTH2), and putative metalloendoproteinase 2-MMP in R48. Two enriched GO terms of the downregulated genes (response to auxin and sexual reproduction) appeared in R48. Response to auxin was enriched by *SAUR21* and *SAUR71*, while sexual reproduction was enriched by two expansin genes A1 and B2.

Inter-genotype analysis revealed seven enriched GO terms for controls, RT, and ST. The expression levels of most of these genes were higher in ST than in RT (Fig. 7B). At 24 HAI, nine GO terms were enriched, and expression of all these genes were higher in S24 than in R24 (Fig. 7B). No enriched GO term was identified at 48 HAI. Only two GO terms (enzyme inhibitor activity and ADP binding) were enriched for genes with higher expression levels in RT. The GO term enzyme inhibitor activity was enriched by the following DEGs: putative pectinesterase/pectinesterase inhibitor 54 (Tc09v2_g006040), 21 kDa protein (Tc03v2_g021470), and pectinesterase 2 (Tc02v2_g024980). The GO term ADP binding was enriched by genes encoding putative disease-resistance proteins in both genotypes. Two of the genes, namely putative disease resistance protein At4g11170 (disease resistance protein of the TIR-NBS-LRR class family) and putative disease resistance protein RPS2, which contains a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats, showed the highest expression levels in RG.

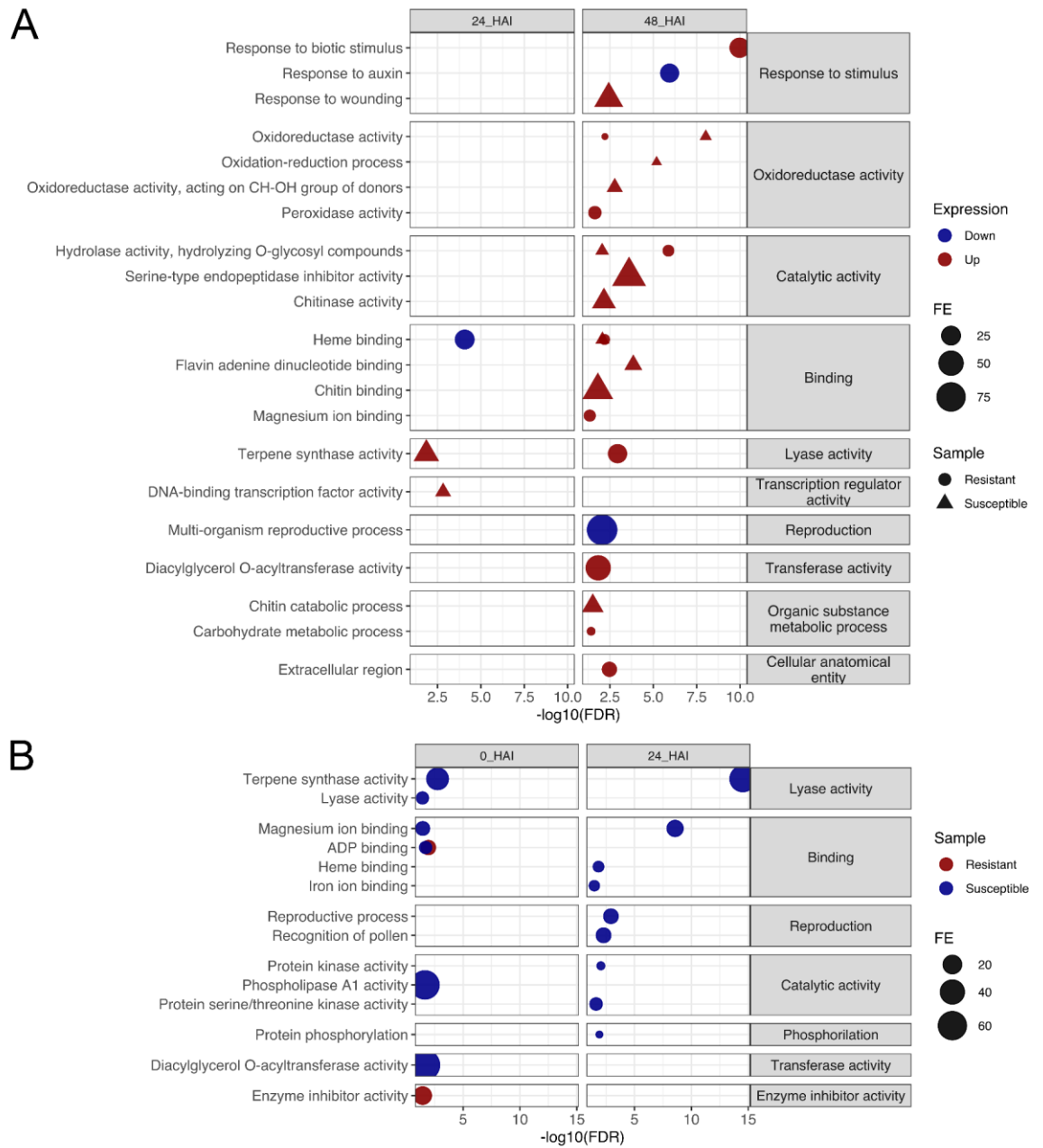


Figure 7. Graphic representation of GO enrichment analysis of DEGs between susceptible and resistant *Theobroma grandiflorum* genotypes challenged with *Moniliophthora perniciosa*. A) Intra-genotype analysis. B) Inter-genotype analysis. Transcripts with higher expression levels in the susceptible genotype are indicated in blue, while those with higher expression levels in the resistant genotype are indicated in red. FE = frequency of expression. R = resistant, S = susceptible, RT and ST = non-inoculated controls, R24 and S24 = 24 HAI, R48 and S48 = 48 HAI.

DISCUSSION

In the present study, depth sequencing and differential gene expression analysis were used to identify genes involved in resistance to *M. perniciosa* in *T. grandiflorum* for better understanding the molecular basis of disease resistance mechanism.

***T. grandiflorum* transcriptome assembly**

Using RNA-Seq and *T. cacao* genome as the reference (Argout et al. 2011), genes expressed in meristematic apical shoots, one of the target tissues of *M. perniciosa*, were described on a large scale. The genome sequence of cacao has already been used as reference to construct a high-density genetic map of cupuassu through genotyping-by-sequencing. Regarding to synteny, the average homology between the linkage groups of the two species has been reported to be 97.2% (Mournet et al. 2020). Furthermore, the transferability of molecular markers between the two species has been reported (ALVES et al. 2006; Kuhn et al. 2010; Santos et al. 2016a; da Silva et al. 2017).

The transcriptome sequence assembled in the present study is a valuable resource, considering that only a few genes are described in the NCBI data bank, with a majority (126) being related to *T. grandiflorum* chloroplast genome (Niu et al. 2019) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=theobroma%20grandiflorum>, accessed on September 30, 2021).

Differential gene expression

In response to pathogen challenge, the analysis revealed 440 putative genes associated with early resistance mechanisms, corresponding to 2.5% of the total unigenes. In a study on cacao, also performed at the early stages of infection (24 to 72 HAI) using cDNA macroarray, only a few DEGs were described (111 DEGs among 2,855 genes analyzed, i.e., 3.9%) (da Hora Junior et al. 2012). In the present study, the tested cupuassu genotypes exhibited a differential response at the initial stages of infection (up to 48 HAI). Specifically, in SG, the defense machinery was activated earlier than that in RG (24 HAI), as evidenced by the upregulation of most of its DEGs. This response may be related to the establishment of the pathogen in tissues. Interestingly, previous studies have shown that susceptible cacao manifests an early but ineffective defense response and is unable to halt the disease (Leal et al. 2007; da Hora Junior et al. 2012; Teixeira et al. 2014). Indeed, more *M. perniciosa* hyphae were detected in susceptible cacao (Sena et al. 2014).

In the present experiment, RG appeared to respond later, with a significant increase in the number of DEGs from 24 to 48 HAI, with a more balanced ratio between upregulated and downregulated genes.

Therefore, susceptibility to *M. perniciosa* may be associated with differences in gene expression profiles. In SG, disease establishment may be related to the higher expression levels of susceptibility genes. In the present study, among non-inoculated controls, several genes in SG showed an expression level that was reached by genes in RG only at 48 HAI, such as expansin B1, ERF9, and thaumatin-like protein, which have been implicated in susceptibility. Specifically, in *A. thaliana*, expansin EXLA2 is required for *Botrytis* and *Alternaria* infection (Van Schie and Takken 2014), and ERF9 overexpression allows plant colonization by an endophytic fungus (Camehl and Oelmüller 2010). Thaumatin-like proteins are produced by *M. perniciosa*, and they likely facilitate competition with endophytes, allowing their own establishment (Franco et al. 2015).

Overall, this set of genes provides clues into effective defense mechanisms. Therefore, some key categories of genes, including PRRs, TFs, and PRs, were addressed in this work and DEGs were subjected to GO enrichment and phytohormone signature analyses.

Pattern-recognition receptors

PRRs are transmembrane receptors that perceive extracellular molecules and activate a defense program known as PAMP-triggered immunity (PTI). PRRs comprise receptor-like kinases (RLKs, or receptor kinases) and receptor-like proteins (RLPs) (Han 2019). These genes provide a greater ability to perceive the presence of a pathogen and thus trigger a response. Here, it was demonstrated that some PRRs (Fig. 8) were activated in RG at 48 HAI. Heterologous PRR expression enhances drug resistance. In sweet orange, the expression of predicted *A. thaliana* LRR-RLK, an elongation factor-Tu receptor, enhanced resistance to citrus canker (Mitre et al. 2021). In addition, a mutation in LysM RLK1, a PRR required for chitin signaling in *A. thaliana*, increased susceptibility to fungal pathogens (Wan et al. 2008). In the present study, the inter-genotype analysis revealed higher expression levels of some PRRs in RG than in SG. Thus, these cupuassu PRR genes may be involved in recognizing *M. perniciosa* and triggering host defenses to halt infection.

Transcription factors

TFs are proteins involved in a multitude of biological processes and are implicated in defense against plant pathogens (John et al. 2021). In the present study, analysis of TFs demonstrated marked differences in their expression patterns depending on the genotype and time of *M. pernicioso* inoculation.

Among the differentially expressed TFs, some belonged to the WRKY family, which is known to be involved in biotic and abiotic stress responses (Rushton et al. 2010). Here, it was demonstrated that the transcript levels of tgWRKY40 and tgWRKY60 were increased in S24 but decreased in R48. WRKY40 is associated with susceptibility to *M. pernicioso* in cacao (Silva Monteiro de Almeida et al. 2017) and to the hemibiotrophic fungus *Dothiorella gregaria* Sacc. in *Populus trichocarpa* (Karim et al. 2015).

In addition, WRKY72 was up-regulated in S48. Hou et al. (Hou et al. 2019) showed that WRKY72 suppressed JA biosynthesis in rice. Thus, tgWRKY72 likely plays the same role in cupuassu, since its expression level was higher in S48 and its phytohormone signature was weakly correlated with JA treatment. Additionally, this TF suppressed the gene encoding oxophytodienoate reductase, an enzyme involved in JA synthesis, as evidenced by its downregulation in S48.

MYB82 was downregulated in S24 and slightly upregulated in R48 (Fig. 3A). MYB82 is directly involved in the formation of trichomes (Liang et al. 2014), which is a site of *M. pernicioso* penetration (Sena et al. 2014). Considering cytokinin is potentially involved in trichome formation (Greenboim-Wainberg et al. 2005; Li et al. 2021) and resistance to pathogen (Albrecht and Argueso 2016; Akhtar et al. 2020), it is possible that a relationship between cytokinin and MYB82 could be part of a mechanism used to prevent fungal invasion.

ERF9 showed the largest fold-change among the TFs evaluated in intra-genotype analysis. Specifically, its expression was increased nearly 100-fold in R48. The inter-genotype analysis showed that in SG, ERF9 was already expressed at this level in the non-inoculated control, and this level persisted at 24 and 48 HAI. ERF9 is a negative regulator of stress resistance in *A. thaliana* (Maruyama et al. 2013), and it is involved in endophyte establishment (Camehl and Oelmüller 2010). RG could maintain a different endophyte microbiome, thereby preventing WBD development. In addition, *M.*

perniciosa has been identified as an endophyte in a cacao-resistant variety (Lana et al. 2011).

JUB1, which belongs to the NAC TF class, was also upregulated in R48. TFs of this class serve important functions in plant development and abiotic stress response and can also act as regulators of plant immunity against fungal pathogens (Nakashima et al. 2012; Yuan et al. 2019). In *Arabidopsis*, JUB1 (AT2G43000) was induced by infection of the biotrophic fungus *Golovinomyces orontii* (Chandran et al. 2009), whereas in grapevines, the JUB1 ortholog NAC-like transcription factor 42 [VIT_12s0028g00860] was responsive to infection by the biotrophic fungus *Erysiphe necator* (Schw.) Burr, which is the causative agent of powdery mildew (Toth et al. 2016). Considering that *M. perniciosa* is in the biotrophic phase at the early stages of disease, JUB1 upregulation in R48 may be associated with defense against this fungus.

Overall, this dataset suggests that several TFs play pivotal roles in plant defense against *M. perniciosa*, indicating candidate genes for further studies.

Pathogenesis related proteins

Plant PR proteins are induced in response to biotic and abiotic stresses (Van Loon 1997; van Loon et al. 2006). In the present study, a group of PRs was upregulated in S48 but downregulated in R48, indicating opposite gene expression profiles according to the genotype. (Teixeira et al. 2014) studied the transcriptome of susceptible cacao infected by *M. perniciosa* and reported at least 67 upregulated PRs; however, they were not sufficient to prevent disease progression.

Another hypothesis is that a set of PRs expressed in SG may inhibit endophytic fungi, which normally colonize cupuassu tissues, and this inhibition may eventually favor *M. perniciosa* infection. This hypothesis is supported by the fact that *M. perniciosa* also expresses some PR-like proteins, such as MpPR-1 and MpTLP, and these PRs have been proposed to inhibit competing fungi (Teixeira et al. 2012; Franco et al. 2015).

Meanwhile, another group of PRs was exclusively upregulated in R48, such as cationic peroxidase 1, acidic endochitinase, major allergen pru proteins, chitinase 1, glucan endo-1,2-beta-glucosidase, and peroxidase 5, which are also involved in disease resistance.

Phytohormone signature analysis

The modulation between disease and resistance is related to the induction of hormonal changes and complex crosstalk (Robert-Seilaniantz et al. 2011). To gain insights into the hormonal aspect of resistance in cupuassu, phytohormone signatures were evaluated in RG and SG in response to *M. perniciosa*. A clear difference in hormonal changes between the genotypes following inoculation was observed. In a previous study, HORMONOMETER analysis was performed for cacao green brooms to detect hormonal imbalances during WBD development (Teixeira et al. 2014).

One of the mechanisms used by fungi to establish disease in cacao is linked to the presence of auxin (Kilaru et al. 2007). The HORMONOMETER analysis of cupuassu revealed that SG was correlated with the presence of auxin, while R48 was not. Furthermore, genes responsive to auxins, such as *SAURs*, were downregulated in R48. It is known that SAUR19–24 are positive regulators of cell expansion (Spartz et al. 2012). Thus, the lack of expression of these genes in RG can limit cell expansion—a process that occurs during *M. perniciosa* infection (Teixeira et al. 2014), thereby restricting pathogen establishment.

Next, the involvement of SA and JA pathways in resistance mechanisms was evaluated. SA is the most important phytohormone for the regulation of defense against biotrophic and hemibiotrophic pathogens, whereas JA enhances resistance to necrotrophic pathogens (Robert-Seilaniantz et al. 2011; Fu and Dong 2013). The antagonism between SA and JA is well-known (Pieterse et al. 2012; Verma et al. 2016). Here, the results indicated that R48 favored response via the SA pathway, antagonizing the JA pathway, while SG presents gene expression responses related to increased levels of SA and JA, as early as 24 HAI. This may be the core of susceptibility. Furthermore, the SG has higher levels of transcripts of genes known to be related to acquired resistance, a process known to be initiated by SA. It is already known that *M. perniciosa* produces and induces an increase of IAA and SA phytohormone in cacao leaves and the presence of SA or JA stimulates mycelial growth (Kilaru et al. 2007). Therefore, increasing levels of these phytohormones benefits the fungus.

A hormonal signature that calls attention is the significant correlation index of CK (zeatin180) in R48, unlike that in S24 and S48. This phytohormone plays pivotal roles in pathogen resistance (Albrecht and Argueso 2016; Akhtar et al. 2020). In rice, the

synergism between SA and CK augments resistance to the hemibiotrophic fungus *Magnaporthe oryzae* (Jiang et al. 2013). Considering that *M. perniciosa* is also a hemibiotrophic fungus, this process may occur in cupuassu trees, as evidenced by the strong correlation between CK and SA signatures in R48. Moreover, a crosstalk was observed when the response of RG to BRs was analyzed. The response profile of R48 to BRs was negatively correlated with the response profile of *Arabidopsis* to this hormone. BRs are involved in plant growth and development (Cheng et al. 2017), and their responses to pathogens are based on the growth and defense balance (Huot et al. 2014). In addition, plants defective in their response to BRs show greater resistance to fungi (Goddard et al. 2014; Ali et al. 2014). Here, the results indicate that RG exhibited hormonal balance, inhibiting growth-promoting pathways, decreasing BRs, and increasing SA-induced defense responses. Furthermore, there was a negative correlation with ethylene, indicating the occurrence of an SA-mediated defense mechanism against biotrophic rather than necrotrophic fungi (Li et al. 2019), as expected in the initial phase of *M. perniciosa* infection.

Overall, the signaling pathways and crosstalk between hormones begin very early after pathogen inoculation, and hormonal interplay is crucial for an efficient defense response. Of note, however, these responses are also affected by other stresses to which plants are subjected in the field, including insects or other microorganisms.

GO enrichment

To better understand the overall scenario of transcriptomic differences, either intra- or inter-genotype, GO enrichment analyses were performed.

GO data revealed significant differences in response to pathogen inoculation, and this difference was more evident at 48 HAI, as shown by intra-genotype analysis. In SG response, no GO term of downregulated genes was enriched. In contrast, in RG response, three terms of downregulated genes were enriched (response to auxin, heme binding, and sexual reproduction). The GO term sexual reproduction was enriched by two expansin genes (A1 and B2), which were downregulated in R48. Expansins play diverse biological roles in plant development, involving the loosening of cell walls (Marowa et al. 2016), and their suppression has been described in resistance to phytopathogens (Abuqamar et al. 2013; Ding et al. 2018). Thus, the downregulation of these genes in R48 may prevent cell wall expansion, thereby limiting *M. perniciosa* development. This speculation is

consistent with the GO term extracellular region, which was enriched with upregulated genes in R48, comprising enzymes involved in cell wall construction and extracellular matrix degradation and remodeling, such as xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 2 (XTH2) and putative metalloendoproteinase 2-MMP (Stratilová et al. 2020).

Interestingly, the GO term response to the stimulus showed a clear difference between the genotypes at 48 HAI. In SG, terms related to the response to wounding were enriched. Meanwhile, in RG, terms related to the response to biotic stimuli were enriched by genes, such as the major allergen Pru ar 1, PR-4B, and MLP-like protein 3. Therefore, these genes may be reliable candidates as determinants of resistance mechanisms and can serve as targets of further studies.

Differences between the responses of genotypes to oxidoreductase activity indicate an important role of ROS in resistance mechanisms. ROS accumulation is involved in susceptibility and resistance to pathogens in cacao, depending on the pathway triggered. Fister et al. (2015) reported that when plants were treated with SA to mimic pathogen infection, the expression levels of genes potentially involved in ROS accumulation were higher in the chloroplasts and mitochondria of a WBD-resistant genotype (Sca6) than in those of a susceptible one (ICS1) (Fister et al. 2015). Here, peroxidase activity was the most enriched GO term related to oxidoreductase activity in R48. Similar results have been reported in cacao, in which two peroxidases were expressed at higher levels in resistant cultivars (Leal et al. 2007). Similarly, Camillo et al. (2013)(Camillo et al. 2013) showed that cytosolic ascorbate peroxidase is involved in cacao resistance to *M. pernicioso* (Camillo et al. 2013).

Another important difference was related to the GO term terpene synthase activity. It was enriched as early as 24 HAI in SG and enriched only at 48 HAI in RG, although the genes in each GO term differed between the genotypes. Terpene synthases are involved in the production of precursors to numerous terpenoids, including phytohormones, such as ABA (Nambara 2017). This report is consistent with the results of *T. grandiflorum* hormone analysis, which showed that at 24 HAI, SG presented a response equivalent to ABA treatment. As genes in the enriched GO terms differed between the two genotypes, the composition of terpenes may have varied among the plants, leading to distinct pathogen responses.

In RG, two GO terms were enriched by upregulated genes, namely enzyme inhibitor activity and ADP binding. The former was enriched by pectinesterases/pectinesterase inhibitors, whose action affects the texture and rigidity of the cell wall (Pelloux et al. 2007). This result supports the notion that cell wall alterations are involved in molecular defense mechanisms.

Next, the GO term ADP binding was enriched in genes encoding putative disease resistance proteins in both genotypes. Here, disease resistance proteins of the TIR-NBS-LRR family and the putative disease resistance protein *RPS2*, harboring a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats, were highlighted, as their expression levels were the highest in RG. In transgenic rice, *RSP2* triggered a resistance response to the hemibiotrophic fungus *M. oryzae* (Li et al. 2019). Here, the higher expression of these receptors in RG indicates a mechanism of resistance.

This work suggests that the resistance and susceptibility in cupuassu may be related to the microenvironment that the fungus encounters in the first hours of interaction in the contrasting genotypes. This microenvironment could influence the colonization and manipulation of meristematic cells by *M. perniciosa*. In the susceptible plants, the fungus finds a typical environment of acquired systemic response, which can alter the endophytic community, which in turn could favor the pathogen. In 24 h, the increase of phytohormones, such as auxins, SA, and JA benefits mycelial growth. In the resistant plants, the fungus encounters a greater amount of proteins related to cell wall modification, which may hinder the manipulation of the cell wall by the fungus. Additionally, in RG, the fungus faces a greater amount of some PRRs-like proteins, which may be involved in the activation of differentiated and efficient defense cascades, resulting in differences related to auxin response, cell wall expansion, biotic stress responses, ROS detoxification and phytohormones balance (Fig. 8). These insights indicate avenues for more detailed studies of genes and defense mechanisms involved in the *Theobroma-M. perniciosa* interaction.

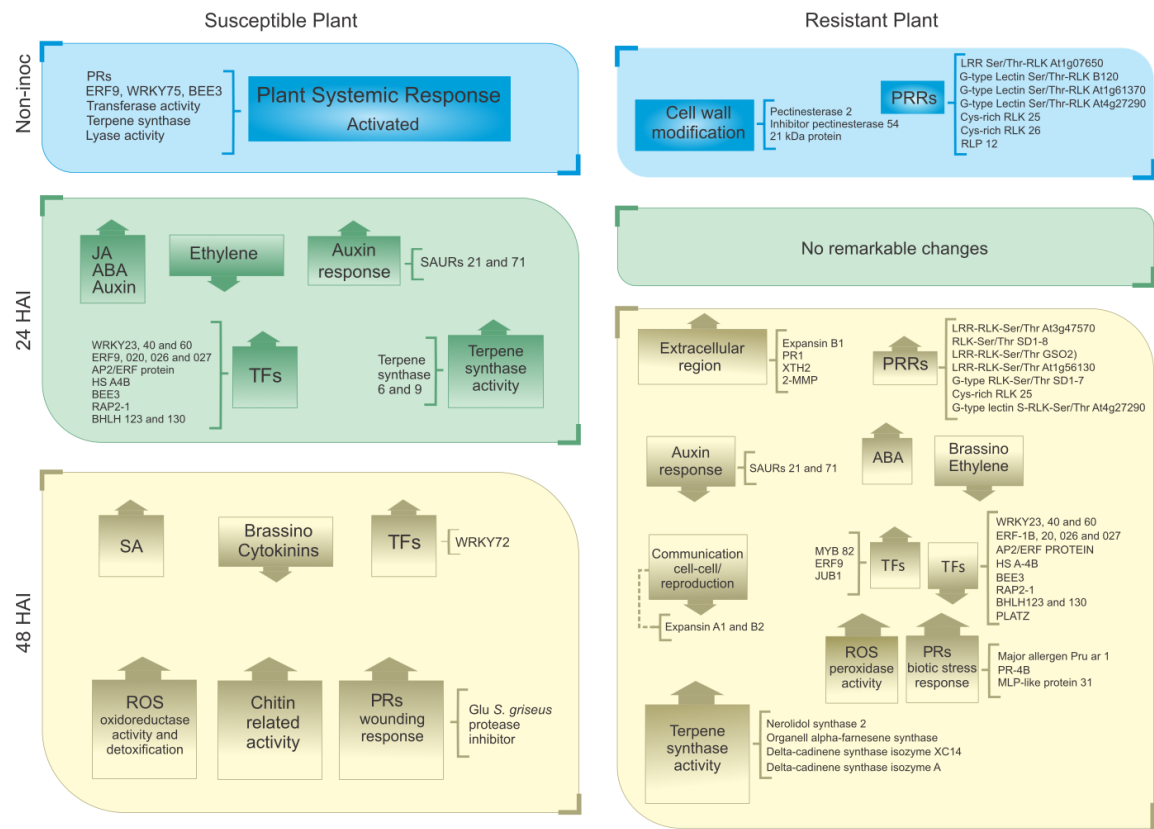


Figure 8. Schematic representation of the major differences in gene expression between susceptible and resistant cupuassu genotypes (SG × RG) in response to *Moniliophthora perniciosa*. The differences were compiled using differential expression analysis of the RNA-Seq data of non-inoculated plants, and inoculated plants at 24 and 48 HAI. Up and down arrows indicate up- or down-regulated genes, respectively. Specific identified genes are shown outside the boxes. PRs = pathogenesis-related proteins; PRRs = pattern-recognition receptors; TFs = transcription factors; MJ = methyl jasmonate; ABA = abscisic acid; SA = salicylic acid; ROS = reactive oxygen species.

CONCLUSIONS

T. grandiflorum transcriptome depth sequencing and mapping to the *T. cacao* genome identified 21,441 unigenes, generating the most comprehensive transcript database of cupuassu apical shoots so far. This dataset represents the first transcriptome of *T. grandiflorum*–*M. perniciosa* interactions at very early and asymptomatic stages of WBD. The results revealed critical molecular differences between contrasting cupuassu genotypes with respect to their susceptibility and resistance to WBD. These data can serve as a valuable resource for further analyses aimed at elucidating the mechanisms of resistance and susceptibility in cupuassu trees, supporting the development of cupuassu breeding programs and WBD control measures. Furthermore, considering the relatedness of *T. grandiflorum* and *T. cacao*, the cupuassu–*M. perniciosa* pathosystem can also benefit the understanding of the cacao–*M. perniciosa* pathosystem.

Supplemental Material

Figure S1. Analysis of 10 RNA-Seq DEGs using qRT-PCR. A) Comparison of the expression values (Log2 FC) of 10 genes obtained using qRT-PCR and RNA-Seq of the susceptible and resistant genotypes of *Theobroma grandiflorum* challenged with *Moniliophthora perniciosa* at 24 and 48 HAI (S24, S48, R24, and R48). B) Pearson's correlation and linear regression between gene expression values (Log2 FC) obtained from RT-qPCR and RNA-Seq.

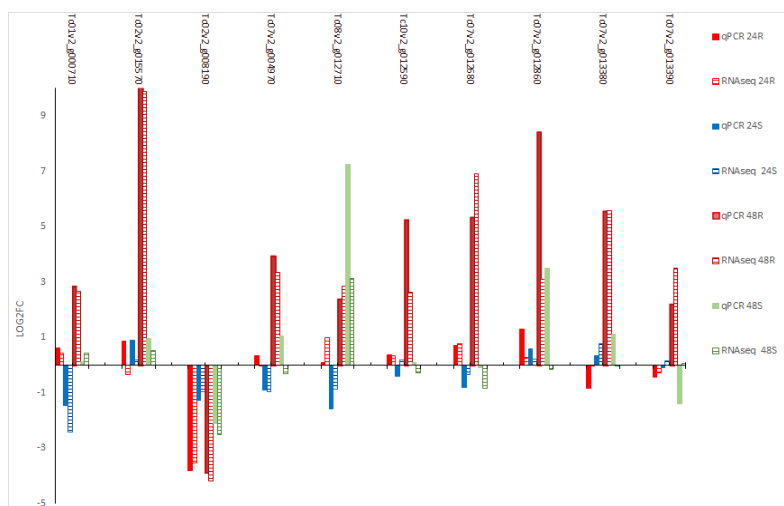
Table S1. Primers used in qRT-PCR analysis of *Theobroma grandiflorum* DEGs

Table S2. Sequencing metrics of RNA-Seq libraries from apical shoots of *Theobroma grandiflorum* challenged with *Moniliophthora perniciosa*.

Table S3. Differentially expressed genes (DEGs) in *Theobroma grandiflorum* challenged with *Moniliophthora perniciosa*. A) Intra-genotype and B) inter-genotypes analysis data.

Figure S1. Analysis of 10 RNAseq DEGs by quantitative PCR. A) Comparison of 10 genes expression values (Log2 FC) obtained by qPCR and RNAseq of *T. grandiflorum* susceptible and resistant genotypes challenged with *M. perniciosa* at 24 and 48 HAI (S24, S48, R24 and R48). B) Pearson correlation coefficient and linear regression between gene expression values (Log2 FC) obtained from RT-qPCR and RNAseq.

A



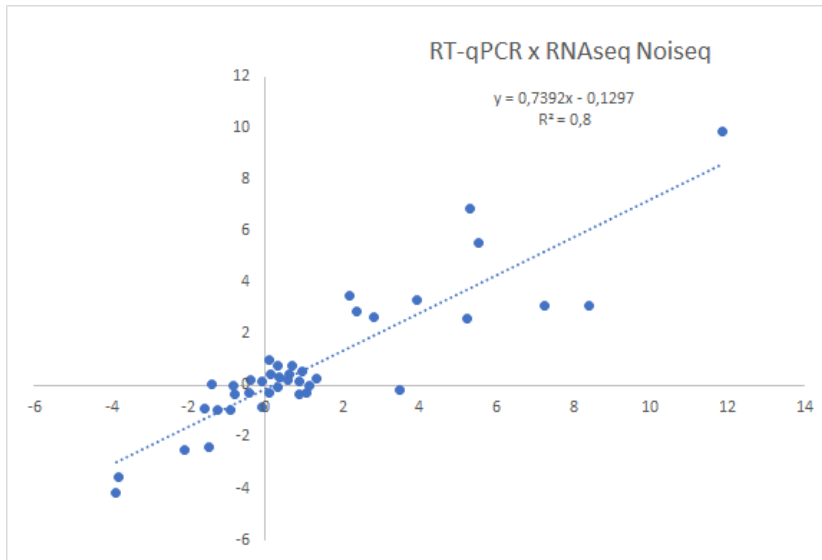
B

Figure S1. Analysis of 10 RNAseq DEGs by quantitative PCR. **A)** Comparison of 10 genes expression values (Log2 FC) obtained by qPCR and RNAseq of *Theobroma grandiflorum* susceptible and resistant genotypes challenged with *Moniliophthora perniciosa* at 24 and 48 HAI (S24, S48, R24 and R48). **B)** Pearson correlation coefficient and linear regression between gene expression values (Log2 FC) obtained from RT-qPCR and RNAseq. The genes are identified with the cocoa IDs orthologous to cupuassu transcriptome: Tc01v2_g000710 = chitinase chromo 1, Tc02v2_g015570 = Putative Ethylene-responsive transcription factor 9, Tc02v2_g008190 = Ferredoxin-nitrite reductase, chloroplastic, Tc07v2_g004970 = (+) delta-cadinene synthase isozyme XC14, Tc08v2_g012710 Pathogen-related protein, Tc10v2_g012590 = Acidic endochitinase, Tc07v2_g0012680, Tc07v2_g012860, Tc07v2_g013380 and Tc07v2_g013390 = different proteins containing domain unknown function (DUF247).

Table S1. Primers used in qRT-PCR analysis of *Theobroma grandiflorum* DEGs.

ID genoma <i>T. cacao</i>	annotation	primer foward	primer reverse
Tc01v2_g000710	Chitinase chromo 1	5'AGGTTTTGGTGACTGTGG3'	5' CAGGAAAAGCGATAAACG3'
Tc02v2_g015570	Putative Ethylene-responsive transcription factor 9	5'AACCTTGCTTACAATCG3'	5'TGGAGTTGAGTTGAGTATGG3'
Tc02v2_g008190	Ferredoxin--nitrite reductase, chloroplastic	5'CCAAGCCGGTAAGGATGCAC3'	5'GGAACACATCTGCCCTTCG3'

Tc07v2_g004970	(+)-delta-cadinene synthase isozyme XC14	5'CCCTTCGACCGTTGAGTGCT3'	5'CTGGCTCTGGCACTGCTGTT3'
Tc07v2_g012680	Putative UPF0481 protein At3g02645	5'CATCGAAGACGTTGAGCTGCTT3'	5'ATCGCTCTCAAGGGCTTTGG3'
Tc07v2_g012860	Putative UPF0481 protein At3g47200	5'TGGAAACTTGGTTTTTCGTGAGGA3'	5'CCATGGTCCAAAAATAACTGTCACAA3'
Tc07v2_g013380	Putative UPF0481 protein At3g47200	5'TCAATTCTCTGCGGCCCAAT3'	5'GGCGCAGCCAAGTAATTCCA3'
Tc07v2_g013390	Putative UPF0481 protein At3g47200	5'TGTGTTGCCCTGGAGCAATG3'	5'CGCGTGTGATAACGTCCACA3'
Tc08v2_g012710	Pathogen-related protein	5'GCTGGGAGGTCTGCTGAAGG3'	5'GCAAGGGCGACCTCAAAGAG3'
Tc10v2_g012590	Acidic endochitinase	5'CCCATGCCAGTACCGTGA3'	5'AGAAGGAGCCGCATCCACA3'
Reference gene	Malate dehydrogenase (MDH)	5'ATTCAGAAGGGCGTTTCCTT3'	5'CCATAGCACAGGGTTTTGGT3'

Table S2. Sequencing metrics of the RNA-seq libraries of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) apical shoots challenged with *Moniliophthora perniciosa*.

Libraries	Number of input reads	Uniquely mapped reads number	Uniquely mapped reads %	% of reads mapped to multiple loci	% of reads unmapped: too short	% of reads unmapped: other
RTA	13,402,111	11,605,470	86.59%	4.06%	9.05%	0.27%
RTB	14,798,500	12,541,003	84.75%	3.90%	10.86%	0.45%
RTC	9,871,380	8,489,998	86.01%	4.21%	9.36%	0.39%
STA	15,887,480	12,983,396	81.72%	4.72%	12.95%	0.56%
STB	15,876,367	13,751,941	86.62%	4.46%	8.47%	0.41%

STC	14,48,470	12,294,028	84.90%	3.93%	10.71%	0.41%
R24A	2,122,219	18,390,732	86.66%	4.28%	8.65%	0.38%
R24B	10,353,612	8,878,716	85.75%	4.62%	9.01%	0.56%
R24C	8,608,976	7,186,072	8.47%	4.87%	10.95%	0.63%
S24A	12,556,730	10,962,587	87.30%	4.37%	7.77%	0.51%
S24B	9,371,562	7,623,694	81.35%	5.32%	12.52%	0.73%
S24C	10,316,053	8,592,756	83.29%	5.26%	10.61%	0.75%
R48A	14,801,977	12,617,757	85.24%	4.30%	9.97%	0.43%
R48B	9,565,727	8,000,368	83.64%	4.52%	11.27%	0.52%
48C	16,559,819	14,023,771	84.69%	4.82%	10.09%	0.35%
S48A	10,633,244	8,767,305	8.45%	4.29%	12.74%	0.46%
S48B	12,516,146	10,653,080	85.11%	5.02%	9.32%	0.50%
S48C	13,402,691	11,613,391	86.65%	4.62%	8.22%	0.47%

T = Non-Inoculated, S = susceptible, R = resistant at their respective time after inoculation (24 or 48 HAI), A, B and C = biological triplicate. Each library was prepared in biological triplicate.

Table S3. Differentially expressed genes (DEGs) in *Theobroma grandiflorum* challenged with *Moniliophthora perniciosa*. **A)** Intra-genotype analysis data. **B)** Inter-genotypes analysis data.

Arq.excel- <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17429145.2022.2144650>

Acknowledgments

The authors thank Dr. Orzenil B. Silva Júnior and Dr. Robert N.G. Miller for the critical review of this manuscript, comments, and suggestions. We are also grateful to the Cirad

(Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Development) for participating of the joint research project, TheoBRomics. We thank Editage (www.editage.com) for English language editing.

Statements and Declarations

Funding

This work is part of an international project (TheoBRomics) funded by a tripartite call involving Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation), Capes (Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education) and Agropolis Foundation. Cupuassu population maintenance, basidiospores collection, storage and inoculation were funded by CEPLAC (Executive Commission of the Cacao Farming Plan).

Competing Interest

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

Data Archiving Statement

The database was deposited in the NCBI Sequence Read Archive (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/>) under accession number (the deposit is in process; the accession numbers will be supplied once available).

Author Contributions

LLF and LHM conceived and designed the experiments. LLF performed the experiments. PG, RCT, and MMCC performed bioinformatic analyses. MMB provided intellectual and editorial comments. PSBA provided the plant material and developed the inoculation method. RMA developed cupuassu clones. LHM and MMB are advisors to LLF. LLF, JOSW, and LHM performed data analysis and wrote the manuscript. LHM supervised this project. All authors have read and approved the submitted version of the manuscript.

References

Abuqamar S, Ajeb S, Sham A, et al (2013) A mutation in the expansin-like A2 gene enhances resistance to necrotrophic fungi and hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Pathol* 14:813–827.

<https://doi.org/10.1111/mpp.12049>

Aime MC, Phillips-Mora W (2005) The causal agents of witches' broom and frosty pod

- rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97:1012–1022. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832751>
- Akhtar SS, Mekureyaw MF, Pandey C, Roitsch T (2020) Role of Cytokinins for Interactions of Plants With Microbial Pathogens and Pest Insects. *Front Plant Sci* 10:1777. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01777>
- Albrecht T, Argueso CT (2016) Should I fight or should I grow now? The role of cytokinins in plant growth and immunity and in the growth–defence trade-off. *Ann Bot* 119:mcw211. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw211>
- Ali SS, Gunupuru LR, Kumar GBS, et al (2014) Plant disease resistance is augmented in uzu barley lines modified in the brassinosteroid receptor BRI1. *BMC Plant Biol* 14:227. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0227-1>
- Alves RM, Chaves SF da S, Alves RS, et al (2021) Cupuassu tree genotype selection for an agroforestry system environment in the Amazon. *Pesqui Agropecu Bras* 56:1–10. <https://doi.org/10.1590/s1678-3921.pab2021.v56.02139>
- Alves RM, Filgueiras GC, Homma AKO (2014) Aspectos sócio-econômicos do cupuaçuzeiro na amazônia: do extrativismo a domesticação. In: Mercado, Cadeia Produtiva e Desenvolvimento Rural na Amazônia, 1^a ed. Belém, PA, pp 197–223
- Alves RM, Sebbenn AM, Artero AS, et al (2007) High levels of genetic divergence and inbreeding in populations of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). *Tree Genet Genomes* 3:289–298. <https://doi.org/10.1007/s11295-006-0066-9>
- ALVES RM, SEBBENN AM, ARTERO AS, FIGUEIRA A (2006) Microsatellite loci transferability from *Theobroma cacao* to *Theobroma grandiflorum*. *Mol Ecol Notes* 6:1219–1221. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01496.x>
- Anders S, Pyl PT, Huber W (2015) HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31:166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Argout X, Fouet O, Wincker P, et al (2008) Towards the understanding of the cocoa transcriptome: Production and analysis of an exhaustive dataset of ESTs of *Theobroma cacao* L. generated from various tissues and under various conditions. *BMC Genomics* 9:1–19. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-512>

- Argout X, Salse J, Aury J-M, et al (2011) The genome of *Theobroma cacao*. *Nat Genet* 43:101–108. <https://doi.org/10.1038/ng.736>
- Britto DS, Pirovani CP, Andrade BS, et al (2013) Recombinant β -1,3-1,4-glucanase from *Theobroma cacao* impairs *Moniliophthora perniciosa* mycelial growth. *Mol Biol Rep* 40:5417–5427. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2640-1>
- Calzavara B, Muller C, Da costa O (1984) *Fruticultura tropical: O Cupuaçuzeiro*. Embrapa 104
- Camehl I, Oelmüller R (2010) Do ethylene response factorS9 and -14 repress PR gene expression in the interaction between *Piriformospora indica* and Arabidopsis? *Plant Signal Behav* 5:932–936. <https://doi.org/10.4161/psb.5.8.12036>
- Camillo LR, Filadelfo CR, Monzani PS, et al (2013) Tc-cAPX, a cytosolic ascorbate peroxidase of *Theobroma cacao* L. engaged in the interaction with *Moniliophthora perniciosa*, the causing agent of witches' broom disease. *Plant Physiol Biochem* 73:254–265. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.10.009>
- Ceita G de O, Macêdo JNA, Santos TB, et al (2007) Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Sci* 173:106–117. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.04.006>
- Chandran D, Tai YC, Hather G, et al (2009) Temporal Global Expression Data Reveal Known and Novel Salicylate-Impacted Processes and Regulators Mediating Powdery Mildew Growth and Reproduction on Arabidopsis. *Plant Physiol* 149:1435–1451. <https://doi.org/10.1104/pp.108.132985>
- Chang S, Puryear J, Cairney J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Report* 11:113–116. <https://doi.org/10.1007/BF02670468>
- Cheng X, Gou X, Yin H, et al (2017) Functional characterisation of brassinosteroid receptor MtBRI1 in *Medicago truncatula*. *Sci Rep* 7:9327. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09297-9>
- Costa JL, Paschoal D, da Silva EM, et al (2021) *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. *New Phytol* 231:365–381. <https://doi.org/10.1111/nph.17386>
- da Hora Junior BT, Poloni J de F, Lopes MA, et al (2012) Transcriptomics and systems biology analysis in identification of specific pathways involved in cacao resistance and susceptibility to witches' broom disease. *Mol Biosyst* 8:1507. <https://doi.org/10.1039/c2mb05421c>
- da Silva RA, Souza G, Lemos LSL, et al (2017) Genome size, cytogenetic data and transferability of EST-SSRs markers in wild and cultivated species of the genus *Theobroma* L. (Byttnerioideae, Malvaceae). *PLoS One* 12:e0170799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170799>
- de Nazaré RFR, Barbosa WC, Viégas RMF (1990) Processamento de sementes de cupuaçu para obtenção de cupulate. *Embrapa-Cpatu* 108:38
- Ding Y, Sun T, Ao K, et al (2018) Opposite Roles of Salicylic Acid Receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in Transcriptional Regulation of Plant Immunity. *Cell* 173:1454–1467.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.044>
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29:15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- dos Santos EC, Pirovani CP, Correa SC, et al (2020) The pathogen *Moniliophthora perniciosa* promotes differential proteomic modulation of cacao genotypes with contrasting resistance to witches' broom disease. *BMC Plant Biol* 20:1. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2170-7>
- Fister AS, O'Neil ST, Shi Z, et al (2015) Two *Theobroma cacao* genotypes with contrasting pathogen tolerance show aberrant transcriptional and ROS responses after salicylic acid treatment. *J Exp Bot* 66:6245–6258. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv334>
- Franco SDF, Baroni RM, Carazzolle MF, et al (2015) Genomic analyses and expression evaluation of thaumatin-like gene family in the cacao fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Biochem Biophys Res Commun* 466:629–636. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.054>
- Frias GA, Purdy LH, Schmidt RA (1995) An Inoculation Method for Evaluating

- Resistance of Cacao to *Crinipellis pernicios*a. *Plant Dis* 79:787.
<https://doi.org/10.1094/PD-79-0787>
- Fu ZQ, Dong X (2013) Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annu Rev Plant Biol* 64:839–863.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606>
- Gesteira AS, Micheli F, Carels N, et al (2007) Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora pernicios*a. *Ann Bot* 100:129–140. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm092>
- Goddard R, Peraldi A, Ridout C, Nicholson P (2014) Enhanced Disease Resistance Caused by BRI1 Mutation Is Conserved Between *Brachypodium distachyon* and Barley (*Hordeum vulgare*). *Mol Plant-Microbe Interact* 27:1095–1106.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-03-14-0069-R>
- Greenboim-Wainberg Y, Maymon I, Borochoy R, et al (2005) Cross talk between gibberellin and cytokinin: The Arabidopsis GA response inhibitor SPINDLY plays a positive role in cytokinin signaling. *Plant Cell* 17:92–102.
<https://doi.org/10.1105/tpc.104.028472>
- Han GZ (2019) Origin and evolution of the plant immune system. *New Phytol.* 222:70–83
- Hou Y, Wang Y, Tang L, et al (2019) SAPK10-Mediated Phosphorylation on WRKY72 Releases Its Suppression on Jasmonic Acid Biosynthesis and Bacterial Blight Resistance. *iScience* 16:499–510. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.06.009>
- Huot B, Yao J, Montgomery BL, He SY (2014) Growth–Defense Tradeoffs in Plants: A Balancing Act to Optimize Fitness. *Mol Plant* 7:1267–1287.
<https://doi.org/10.1093/mp/ssu049>
- Jiang C-J, Shimono M, Sugano S, et al (2013) Cytokinins Act Synergistically with Salicylic Acid to Activate Defense Gene Expression in Rice. *Mol Plant-Microbe Interact* 26:287–296. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-12-0152-R>
- John E, Singh KB, Oliver RP, Tan K-C (2021) Transcription factor control of virulence in phytopathogenic fungi. *Mol Plant Pathol* 22:858–881.
<https://doi.org/10.1111/MPP.13056>

- Karim A, Jiang Y, Guo L, et al (2015) Isolation and characterization of a subgroup IIa WRKY transcription factor PtrWRKY40 from *Populus trichocarpa*. *Tree Physiol* 35:1129–1139. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpv084>
- Kilaru A, Bailey BA, Hasenstein KH (2007) *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. *FEMS Microbiol Lett* 274:238–244. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00837.x>
- Kuhn DN, Figueira A, Lopes U, et al (2010) Evaluating *Theobroma grandiflorum* for comparative genomic studies with *Theobroma cacao*. *Tree Genet Genomes* 6:783–792. <https://doi.org/10.1007/S11295-010-0291-0>
- Lana TG, Azevedo JL, Pomella AW, et al (2011) Endophytic and pathogenic isolates of the cacao fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa* (Tricholomataceae) are indistinguishable based on genetic and physiological analysis. *Genet Mol Res* 10:326–334. <https://doi.org/10.4238/vol10-1gmr895>
- Lannes SCS, Medeiros ML, Gioielli LA (2003) Physical interactions between cupuassu and cocoa fats. *Grasas y Aceites* 54:253–258. <https://doi.org/10.3989/gya.2003.v54.i3.239>
- Leal GA, Albuquerque PSB, Figueira A (2007) Genes differentially expressed in *Theobroma cacao* associated with resistance to witches' broom disease caused by *Crinipellis perniciosa*. *Mol Plant Pathol* 8:279–292. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00393.x>
- Leal GA, Gomes LH, Albuquerque PSBB, et al (2010) Searching for *Moniliophthora perniciosa* pathogenicity genes. *Fungal Biol* 114:842–854. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.07.009>
- Li J, Wang X, Jiang R, et al (2021) Phytohormone-Based Regulation of Trichome Development. *Front Plant Sci* 12:734776. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.734776>
- Li N, Han X, Feng D, et al (2019) Signaling Crosstalk between Salicylic Acid and Ethylene/Jasmonate in Plant Defense: Do We Understand What They Are Whispering? *Int J Mol Sci* 20:671. <https://doi.org/10.3390/ijms20030671>
- Liang G, He H, Li Y, et al (2014) MYB82 functions in regulation of trichome

- development in Arabidopsis. *J Exp Bot* 65:3215–3223.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru179>
- Marowa P, Ding A, Kong Y (2016) Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. *Plant Cell Rep* 35:949–965.
<https://doi.org/10.1007/s00299-016-1948-4>
- Maruyama Y, Yamoto N, Suzuki Y, et al (2013) The Arabidopsis transcriptional repressor ERF9 participates in resistance against necrotrophic fungi. *Plant Sci* 213:79–87. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.08.008>
- Meinhardt LW, Rincones J, Bailey BA, et al (2008) *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? *Mol Plant Pathol* 9:577. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2008.00496.X>
- Mitre LK, Teixeira-Silva NS, Rybak K, et al (2021) The Arabidopsis immune receptor EFR increases resistance to the bacterial pathogens *Xanthomonas* and *Xylella* in transgenic sweet orange. *Plant Biotechnol J* 19:1294–1296.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13629>
- Motamayor JC, Mockaitis K, Schmutz J, et al (2013) The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. *Genome Biol* 14:r53. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-r53>
- Mournet P, de Albuquerque PSB, Alves RM, et al (2020) A reference high-density genetic map of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng) and QTL detection for resistance to witches' broom disease (*Moniliophthora perniciosa*). *Tree Genet Genomes* 16:89. <https://doi.org/10.1007/s11295-020-01479-3>
- Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, et al (2012) NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1819:97–103.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.10.005>
- Nambara E (2017) Abscisic Acid. *Encycl Appl Plant Sci* 1:361–366.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00098-8>
- Niu YF, Ni SB, Liu J (2019) The complete chloroplast genome of *Theobroma grandiflorum*, an important tropical crop. *Mitochondrial DNA Part B Resour* 4:4157–4158. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1693291>

- Pelloux J, Rust rucci C, Mellerowicz EJ (2007) New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci* 12:267–77.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.001>
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pieterse CMJ, Van Der Does D, Zamioudis C, et al (2012) Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:489–521.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1008638109140>
- Purdy L, Schmidt R (1996) STATUS OF CACAO WITCHES’ BROOM: Biology, Epidemiology, and Management. *Annu Rev Phytopathol* 34:573–594.
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.573>
- Reisdorff C, Gasparotto L, Lieberei R (2000) Development and production of Cupuaçu plants (*Theobroma grandiflorum*) on degraded areas: implications of water relations. *Ger Work Neotrop Ecosyst* 661–669
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JDG (2011) Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annu Rev Phytopathol* 49:317–343. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114447>
- Royaert S, Jansen J, da Silva DV, et al (2016) Identification of candidate genes involved in Witches’ broom disease resistance in a segregating mapping population of *Theobroma cacao* L. in Brazil. *BMC Genomics* 17:107.
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-2415-x>
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ (2010) WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci* 15:247–258. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.006>
- Salgado JM, Rodrigues BS, Donado-Pestana CM, et al (2011) Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) Peel as Potential Source of Dietary Fiber and Phytochemicals in Whole-Bread Preparations. *Plant food Hum Nutr* 66:384–390.
<https://doi.org/10.1007/s11130-011-0254-0>
- Santana Silva RJ, Alves RM, Peres Gramacho K, et al (2020) Involvement of structurally distinct cupuassu chitinases and osmotin in plant resistance to the

- fungus *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Physiol Biochem* 148:142–151.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.009>
- Santos LF Dos, Fregapani RM, Falcão LL, et al (2016a) First microsatellite markers developed from cupuassu ESTs: Application in diversity analysis and cross-species transferability to cacao. *PLoS One* 11:e0151074.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151074>
- Santos LF Dos, Santana Silva RJ, Oliveira Jordão Do Amaral D, et al (2016b) Selection of reference genes for expression study in pulp and seeds of *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum. *PLoS One* 11:e.0160646.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160646>
- Sena K, Alemanno L, Gramacho KP (2014) The infection process of *Moniliophthora perniciosa* in cacao. *Plant Pathol* 63:1272–1281. <https://doi.org/10.1111/ppa.12224>
- Silva Monteiro de Almeida D, Oliveira Jordão do Amaral D, Del-Bem L-E, et al (2017) Genome-wide identification and characterization of cacao WRKY transcription factors and analysis of their expression in response to witches' broom disease. *PLoS One* 12:e0187346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187346>
- Silva SDVM, Luz EDMN, Almeida OC de, et al (2002) Redescrção da sintomatologia causada por *Crinipellis perniciosa* em cacaueiro. *Agrotropica* 14:1–24
- Spartz AK, Lee SH, Wenger JP, et al (2012) The SAUR19 subfamily of SMALL AUXIN UP RNA genes promote cell expansion. *Plant J* 70:978–990.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2012.04946.X>
- Stratilová B, Kozmon S, Stratilová E, Hrmova M (2020) Plant Xyloglucan Xyloglucosyl Transferases and the Cell Wall Structure: Subtle but Significant. *Molecules* 25:5619. <https://doi.org/10.3390/molecules25235619>
- Surujdeo-Maharaj S, Umaharan P, Butler DR, Sreenivasan TN (2003) An optimized screening method for identifying levels of resistance to *Crinipellis perniciosa* in cocoa (*Theobroma cacao*). *Plant Pathol* 52:464–475.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00865.x>
- Tarazona S, Furió-Tarí P, Turrà D, et al (2015) Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids*

Res 43:e140. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv711>

Teixeira PJPL, De Toledo Thomazella DP, Reis O, et al (2014) High-Resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Cell* 26:4245–4269. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.130807>

Teixeira PJPL, Thomazella DPT, Vidal RO, et al (2012) The Fungal Pathogen *Moniliophthora perniciosa* Has Genes Similar to Plant PR-1 That Are Highly Expressed during Its Interaction with Cacao. *PLoS One* 7:e45929–e45929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045929>

Toth Z, Winterhagen P, Kalapos B, et al (2016) Expression of a Grapevine NAC Transcription Factor Gene Is Induced in Response to Powdery Mildew Colonization in Salicylic Acid-Independent Manner. *Sci Rep* 6:30825. <https://doi.org/10.1038/srep30825>

Van Loon LC (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur J Plant Pathol* 103:753–765

van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu Rev Phytopathol* 44:135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>

Van Schie CCN, Takken FLW (2014) Susceptibility genes 101: How to be a good host. *Annu Rev Phytopathol* 52:551–581. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045854>

Vasconcelos MNL, Silva ML, Maia JGS, Gottlieb OR (1975) Estudo químico das sementes de cupuaçu. *Acta Amaz.* 5:293–295

Verma V, Ravindran P, Kumar PP (2016) Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol* 16:86. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0771-y>

Volodarsky D, Leviatan N, Otcheretianski A, Fluhr R (2009) HORMONOMETER: A tool for discerning transcript signatures of hormone action in the Arabidopsis transcriptome. *Plant Physiol* 150:1796–1805. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138289>

Wan J, Zhang X-C, Neece D, et al (2008) A LysM Receptor-Like Kinase Plays a

Critical Role in Chitin Signaling and Fungal Resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 20:471–481. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056754>

Yuan X, Wang H, Cai J, et al (2019) NAC transcription factors in plant immunity. *Phytopathol Res* 1:3. <https://doi.org/10.1186/s42483-018-0008-0>

Capítulo II-

Análise funcional de genes potencialmente relacionados à resistência e susceptibilidade à vassoura de bruxa em cupuaçuzeiro por expressão heteróloga em tomate Micro-Tom

Autores

Loeni Lüdke Falcão, Joseilde Oliveira Silva Werneck, Eder Marques da Silva, Antônio Figueira, Div Maria de Alencar Dusi, **Marcelo de Macedo Brigido** e **Lucilia Helena Marcellino**

RESUMO

A análise comparativa da expressão gênica de diferentes genótipos de cupuaçuzeiro, suscetível e resistente à vassoura de bruxa (VB), nos estágios iniciais da infecção por *Moniliophthora perniciosa* permitiu identificar diferenças moleculares que podem ajudar a explicar os mecanismos de defesa da planta contra VB. Além de insights sobre o processo de resistência, o estudo gerou uma lista de genes potencialmente importantes neste processo, dentre eles 3 genes foram selecionados para avaliação funcional por expressão heteróloga em tomate Micro-Tom (MT): a) *TgERF9* que codifica para um fator de transcrição, b) *TgTLP1* que codifica para uma proteína semelhante a taumatina TLP1 e 3) *TgPR10.1*. As plantas transformadas, expressando o gene de interesse, foram desafiadas com fungos fitopatogênicos hemibiotróficos (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 e *Verticillium dahliae* raça 2) e um fungo necrotrófico (*Sclerotinia sclerotiorum*). As plantas MT_*TgERF9* e MT_*TgPR10.1* foram desafiadas com *M. perniciosa*. Além disso, foi realizado um estudo da localização de transcritos de *TgPR10.1* nos tecidos da gema apical de cupuaçuzeiro, via hibridização *in situ* (ISH). Todos os patógenos foram capazes de colonizar os tecidos das plantas transformadas e não transformadas. Contudo, apesar de ser visível o escurecimento interno do caule nas plantas inoculadas com *verticillium* e *fusarium*, não foram observados sintomas de murcha, mesmo em situação de déficit hídrico. Além disso, o crescimento das plantas e a produção de frutos não foram alterados em função da infecção. No entanto, as plantas transformadas com *TgERF9* e *TgTLP1* apresentaram uma tendência a serem menores e menos produtivas. Os bioensaios com folhas destacadas indicam que a expressão de *TgTLP1* aumentou a susceptibilidade de MT ao fungo *S. sclerotiorum*. Plantas MT_*TgPR10.1* apresentaram resistência moderada a *S. sclerotiorum*. A expressão deste

gene em MT não afetou o desenvolvimento da VB. Entretanto, MT_TgPR10.1 apresentou alteração na altura, indicando alteração de balanço hormonal. No que se refere a localização dos transcritos de *TgPR10.1* em cupuaçu, foi possível identificar expressão deste gene nos tricomas, no procâmbio, no meristema e nas células da epiderme dos primórdios foliares. A presença destes transcritos, particularmente no procâmbio, indica um papel desta PR no desenvolvimento e crescimento da planta, o qual é afetado por citocininas, fitohormônios reguladores centrais da atividade cambial. Considerando-se que no desenvolvimento da vassoura de bruxa, a hiperplasia e hipertrofia de tecidos são sintomas típicos da doença, o envolvimento deste gene no processo pode ser relevante. Estudos mais detalhados como medidas da concentração de fitohormônios e ROS nos tecidos das plantas, RNAseq das plantas transformadas e efeitos sobre organismos endofíticos são necessários para compreender melhor a função desses genes no processo de resistência e suscetibilidade a doenças.

ABSTRACT

Functional analysis of genes potentially related to resistance or susceptibility to witches' broom in cupuassu by heterologous expression in tomato Micro-Tom

The comparative analysis of the gene expression of different genotypes of cupuassu, susceptible or resistant to witches' broom disease (WBD), in the early stages of infection by *Moniliophthora perniciosa*, allowed identifying molecular differences that may help explain the plant defense mechanisms against WBD. In addition to insights into the resistance process, the study generated a list of potentially important genes in this process, among which 3 genes were selected for functional evaluation by heterologous expression in Micro-Tom (MT) tomatoes: a) the transcription factor *TgERF9* that codes for a transcription factor, b) the thaumatin-like protein (*TgTLP1*) and c) *TgPR10.1*. The transformed plants, expressing the gene of interest, were challenged with hemibiotrophic phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 3, *Verticillium dahliae* race 2) and a necrotrophic one (*Sclerotinia sclerotiorum*). MT_TgERF9 and MT_TgPR10.1 plants were challenged with *M. perniciosa*. Furthermore, a study of the localization of *TgPR10.1* transcripts in the tissues of the apical bud of cupuassu was carried out, via in situ hybridization (ISH). All fungal species were able to colonize plant tissues, either transformed or non-transformed plants. However, despite the darkening into the stem of plants inoculated with *verticillium* and *fusarium*, wilt symptoms were not

observed, even in a water deficit condition. Furthermore, plant growth and fruit production were not affected by infection. Plants transformed with *TgERF9* and *TgTLP1* tended to be smaller and less productive. The detached leaf bioassays indicate that the expression *TgTLP1* increased the susceptibility of MT to the fungus *S. sclerotiorum*. MT_TgPR10.1 plants showed moderate resistance to *S. Sclerotiorum*. Expression of this gene did not affect the development of WBD in MT. Nonetheless, MT_TgPR10.1 presented a height increase, indicating a change in hormonal balance. Regarding the location of the *TgPR10.1* transcripts in cupuassu, it was possible to identify expression of this gene in the trichomes, in the procambium, in the meristem, and in the cells of the epidermis of the leaf primordia. The presence of these transcripts, particularly in procambium, indicates a role for this PR in plant development and growth, which is affected by cytokinins, which are central regulators of cambial activity. Considering that in the development of witches' broom, tissue hyperplasia and hypertrophy are typical symptoms of the disease, the involvement of this gene in the process may be relevant. More detailed studies, such as measurements of phytohormones concentration and ROS into the plant tissues, RNAseq and effects on endophytic organisms are necessary to better understand the function of these genes in the process of resistance and susceptibility to diseases.

INTRODUÇÃO

A expressão heteróloga de genes em plantas para estudo e uso comercial é amplamente usada mundialmente há várias décadas. Dados de sequências e análise da expressão diferencial geram informações que orientam a escolha de genes potencialmente capazes de conferir resistência e compreensão das funções, quando superexpressos em plantas ou parte específica delas (Chiu et al. 2022).

A variedade de tomate (*Solanum lycopersicum*, L.) variedade Micro-Tom (MT) é uma planta modelo para estudos do patossistema *Theobroma- Moniliophthora perniciosa* (Deganello et al. 2014a). Essa variedade quando desafiada com *M. perniciosa* Biotipo S desenvolve os sintomas de vassoura de bruxa, apresentando hipertrofia dos tecidos, superbrotação, diminuição da distância entrenós. A variedade tem ciclo curto (70 a 90 dias), pequeno porte (10 a 20 cm) e um arcabouço de ferramentas para estudos científicos como genoma completamente sequenciado (MIBASE-<http://www.kazusa.or.jp/jsol/microtom/>), uma coleção de mutantes disponível (<http://tomato.nbrp.jp/indexEn.html>) e protocolo para transformação genética estabelecido (Dan et al. 2006; Sun et al. 2006; Pino et al. 2010). Desta forma, o MT é um bom modelo para avaliação funcional de genes relacionados a doença VB. Diversos genes foram identificados durante a interação cupuaçu-*M. perniciosa* (Falcão et al 2022- capítulo I). Na análise de expressão diferencial foram identificados 440 DEGS nos estágios iniciais da infecção (24 e 48 horas após a inoculação-hai) e 301 DEGS em função da diferença entre genótipos (resistente ou suscetível). Dentre estes genes, foram escolhidos três para estudo funcional pela expressão em tomate Micro-Tom: Um gene que codifica para um fator de transcrição (FT) denominado *TgERF9*, e dois genes que codificam para proteínas relacionadas a patogênese (PR), sendo uma PR5 do tipo TLP (Thaumatococcus-like protein - proteína semelhante a taumatococcus) e uma PR10.1, denominados *TgTLP1* e *TgPR10.1*, respectivamente.

ERF9- (Ethylene-responsive transcription factor 9)

Gene com maior diferencial de expressão no transcrito de pontas de galhos de cupuaçu desafiado com *M. perniciosa* (descrito no capítulo I) codifica para o fator de transcrição ERF9. Estudos em *A. thaliana* demonstram que ERF9 está envolvido na repressão de genes que codificam para proteínas responsivas a patogênese (PR), o que facilitou a colonização pelo fungo endofítico *Piriformospora indica* (Camehl and

Oelmüller 2010). Além disso, foi demonstrado que este fator se liga diretamente ao promotor do gene *PDF1.2* e inibe sua expressão. O *knockout* de ERF9 resultou em aumento de transcritos de *PDF1.2* e inibição da infecção pelo fungo fitopatogênico saprofítico *Botrytis cinerea* (Maruyama et al. 2013).

O gene *ERF9* contém em sua sequência proteica um motivo EAR (“*ET response factor-associated amphiphilic repression*” ou “motivo anfifílico de repressão associado a ERF”) que é a forma predominante de motivos de repressão transcricional identificados em plantas. As proteínas que contêm esse motivo desempenham papéis importantes em diversas funções biológicas, regulando negativamente os genes envolvidos em vários processos fisiológicos e de desenvolvimento (Kagale and Rozwadowski 2011). Além disso, possui um motivo DRE [“*dehydration-responsive element binding*” motif (5'-TACCGACAT-3')] na região promotora do gene que é reconhecido por reguladores transcricionais DREB (*DRE-binding proteins*) (Maruyama et al. 2013). *DEAR1* (*DREB and EAR motif protein 1*) é capaz de reprimir ERF9 em *A. thaliana*, sendo que em plantas superexpressando *DEAR1* ocorre o aumento da concentração de ácido salicílico (AS) e da expressão de genes de PRs dependentes de AS e de PR3 (quitinases) e *PDF1.2* que são relacionadas a via de jasmonato/etileno (Tsutsui et al. 2009; Maruyama et al. 2013).

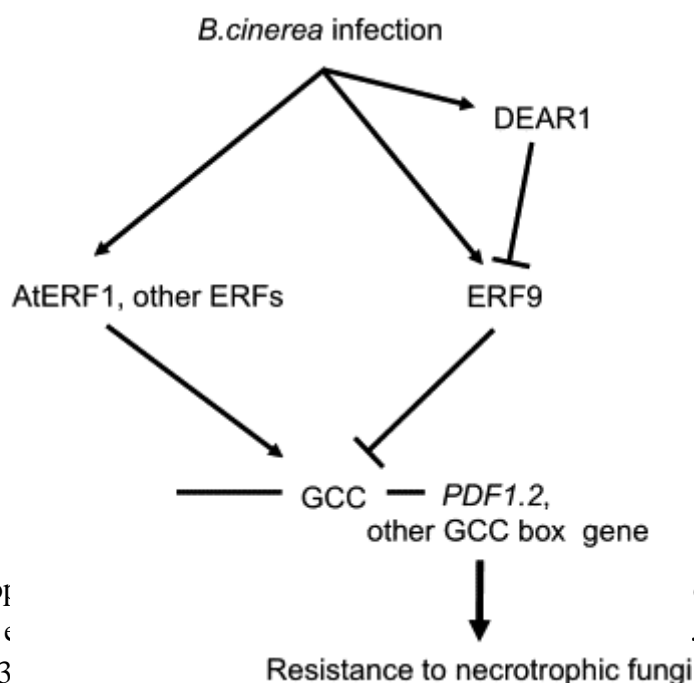


Figura 1. Modelo proposto para a resistência a *Botrytis cinerea*. (→) e (⊥) representam ativação e inibição, respectivamente. Retirado de Maruyama et al. 2013

de DEAR1 a resistência a *B. cinerea*. Retirado de Maruyama et al. 2013

Dados de RNaseq de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., uma planta altamente resistente ao frio, demonstram que transcritos de *PtERF9* foram fortemente aumentados em resposta

a exposição a baixa temperatura. A super expressão de *PtERF9* conferiu tolerância ao congelamento, enquanto que o silenciamento (*virus-induced gene silencing* (VIGS) aumentou a suscetibilidade. O sequenciamento do transcriptoma de plantas com *PtERF9* silenciado resultou na reprogramação transcricional de vasto número de genes responsivos a estresse envolvidos em diferentes processos biológicos. Além disso, foi demonstrado que esse fator de transcrição controla estresse ao frio regulando a homeostase de ROS (*reactive oxygen species*), se ligando diretamente ao promotor (na sequência *GCC-box*) do gene *PtrGSTU17* (*da glutathione S-transferase U17*), aumentando atividade glutathione S-transferase e acumulando menos ROS. O contrário foi observado nas plantas com *PtERF9* silenciado. Ainda, *PtERF9* participa da regulação da biossíntese de etileno, induzindo a expressão *PtrACSI* (ACC sintase 1) através da interação com a sequência *GCC-box* do promotor. Como *PtERF9* é responsivo a presença de etileno (ET), forma-se uma regulação circular (*a feedback regulation loop*) (Zhang et al. 2022).

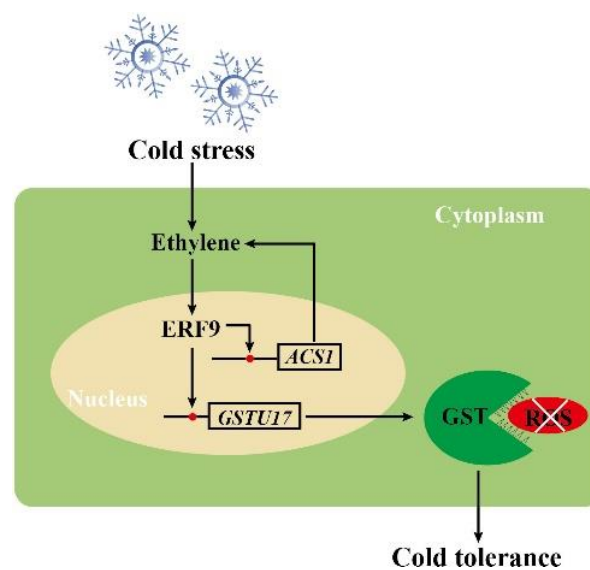


Figura 2- Modelo da função reguladora de *PtrERF9* induzido por frio. Estresse causado por frio induz a produção de etileno que ativa *PtrERF9*. Este se liga a sequência *GCC-box* no promotor de *PtrGSTU17*, resultando na eliminação de ROS da planta. Além disso, o *PtrERF9* aumenta a expressão de *PtrACSI*, gene da biossíntese de etileno, atuando na via de sinalização como um intensificador, aumentando o nível de etileno. Os elementos *GCC-box* são mostrados por círculos vermelhos. Retirada de (Zhang et al. 2022).

PR5 -TLP1 (thaumatin like protein)

As proteínas pertencentes a este grupo são as osmotinas, taumatinas, proteínas semelhantes a osmotinas (Osmotin Like Proteins - OLP) (Singh et al. 1987) e proteínas semelhantes a taumatinas (Thaumatococin Like Proteins - TLP). Devido a semelhanças estruturais com taumatina, proteína de sabor doce encontrada na planta *Thaumatococcus danielli* (Wel and Loeve 1972), o grupo de proteínas relacionadas à patogênese (PR-pathogenesis related) da família 5 (PR5) são denominadas de proteínas semelhantes a taumatinas (TLPs- *thaumatin-like proteins*) (Van Loon 1997; Van Loon et al. 2006; Liu et al. 2010).

Assim como as taumatinas, as TLPs contêm a assinatura desta família, com número de acesso PS00316 e o seguinte padrão de sequência de resíduos de aminoácidos: G-x-[GF]-x-C-x-T-[GA]-D-C-x(1,2)-[GQ]-x(2,3)-C <https://prosite.expasy.org/PS00316#TP> (Liu et al. 2010). A maioria das TLPs tem massa molecular de 21 a 26 KDa e contém 16 resíduos de cisteína conservados. Um grupo menor, apresenta massa molecular de 16 a 17 KDa, com 10 pontes de resíduos de cisteína em posição conservadas, devido a deleção de um peptídeo. As pontes de dissulfetos formadas pelas cisteínas, em posições conservadas, permite o correto dobramento e manutenção da estabilidade das estruturas dessas proteínas, mesmo em condições de pH e temperatura extremos (Fierens et al. 2009). Além disso, as pontes de dissulfetos protegem-nas da ação de proteases (Smole et al. 2008).

O grupo das PR-5, além da atividade antifúngica, apresenta proteínas que também estão envolvidas com estresses abióticos, como tolerância ao frio (Newton and Duman 2000), estresses salinos (Guo et al. 2004) e osmóticos (Zhu et al. 1993)

Em 2020 foi fundada uma base de dados específica para dados de TLPs dos diferentes organismos, com o objetivo de facilitar os estudos dos mecanismos de ação dessas proteínas (<https://tlpdb.cftri.com>) (Gowda et al. 2020). É interessante notar que essas proteínas foram encontradas em diferentes tipos de organismos, nematóides, insetos, fungos e em plantas gimnospermas e angiospermas (Petre et al. 2011). Franco e cols. (2015), a partir da mineração de dados disponíveis nos bancos de dados do Instituto Joint Genome (JGI, <http://www.jgi.doe.gov>) e no Instituto Broad (<http://www.broadinstitute.org>) verificaram a presença de TLPs em 46 genomas fúngicos. Nos 22 genomas de ascomycetos analisados foi encontrada apenas um TLP em cada espécie. No entanto, os basidiomicetos apresentam grandes famílias de TLPs. Foram encontradas TLPs em 23 das 24 espécies analisadas, a exceção foi *Ustilago maydis*. *M. perniciosa* é a espécie de fungo onde foi encontrado o maior número de TLPs (13). Três

grupos de genes de MpTLPs foram detectados no genoma de *M. pernicioso*, que estão em organizados em dois *tandems* em cada grupo. Ainda, há sequências de peptídeos sinal em todos os MpTLPs, indicando que essas proteínas são secretadas. Cinco genes (*MpTLP2*, *MpTLP4*, *MpTLP7*, *MpTLP12* e *MpTLP13*) apresentaram maiores níveis de expressão quando *M. pernicioso* está infectando a planta (*in planta*) (Franco et al. 2015). Os autores propõem que *MpTLP12* poderia se ligar a polissacarídeos da parede celular que podem ser liberados durante o início do estágio de necrose da VB; e tal ligação poderia evitar uma defesa da planta desencadeada por glicoconjugados (Franco et al. 2015).

Outra hipótese levantada é de que o fungo secreta essas proteínas para competir com outros fungos presentes no ambiente. Em plantas há TLPs que apresentam atividade de inibidor de xilanases. Em trigo (*Triticum aestivum*) foi identificada uma TLP- TLXI (thaumatin-like xylanase inhibitor) capaz de inibir xilanases (Fierens et al. 2009). As xilanases endo- β -1,4-xilanases ou endoxilanases são proteínas produzidas por fungos para degradar polissacarídeos da parede celular das plantas, mas também são encontradas em plantas (Simpson et al. 2003).

Os dados gerados com o transcrito de cupuaçu, descritos no capítulo I, mostraram que transcritos de uma TLP estavam em níveis altos nas pontas dos galhos no genótipo suscetível a vassoura de bruxa. O mesmo nível de expressão desse gene foi observado no genótipo resistente somente 48 horas após a inoculação.

PR10.1

As proteínas responsivas a patogêneses do grupo PR10 apresentam atividades enzimáticas nucleosídicas como ribonucleases e (Somssich et al. 1986; Bufe et al. 1996; Biesiadka et al. 2002; Park et al. 2004; Liu et al. 2006; Menezes et al. 2012; He et al. 2013; Wang et al. 2014). No entanto, outras atividades catalíticas estão sendo reveladas como atividade de β -1-3 glucanase encontrada em *Musa acuminata* (MaPR-10 e suas isoformas). Essa PR10 além do conservado domínio para o loop rico em glicina foi encontrada uma sequência do domínio catalítico de uma família glicosídeo hidrolase (Rajendram et al. 2022).

Outra característica universal das PR10 é a atividade de ligação (*Ligand Binding Activity*) que atua no transporte intracelular de ligantes como ácidos graxos, citocininas, brassinosteróides, flavonóides e alcalóides (Biesiadka et al. 2002; Marković-Housley et al. 2003; Mogensen et al. 2007; Zubini et al. 2009; Casañal et al. 2013; Fernandes et al. 2013; Sliwiak et al. 2018; Aglas et al. 2020; Morris et al. 2021) ou ainda, como

reservatório de fitohormônios e como proteínas transportadoras para ajustar a sinalização (Fernandes et al. 2009; Wu et al. 2017; Sliwiak et al. 2018; Morris et al. 2021). Essa característica das PR10 se deve ao fato que independentemente da diversidade de atividades relatadas, todas as proteínas PR-10 compartilham uma dobra comum caracterizada por uma cavidade hidrofóbica, que serve como um local de ligação para uma miríade de moléculas pequenas (Radauer et al. 2008; Fernandes et al. 2013; Seutter von Loetzen et al. 2014; Wu et al. 2017; Aglas et al. 2020; Morris et al. 2021).

Ainda que as sequências das proteínas PR10 sejam diversas, a maioria dos homólogos apresenta uma região particularmente conservada, que contém vários resíduos de glicina (*glycine rich-loop*). Esse domínio está relacionado a atividades catalíticas como de ribonuclease e atividade antifúngica (Chadha and Das 2006; Fernandes et al. 2013; Xu et al. 2014). Outra característica dessas proteínas é a presença de sítios de fosforilação (Bantignies et al. 2000; Park et al. 2004). A fosforilação pode afetar a atividade de ribonuclease, podendo estar envolvida com a especificidade da atividade contra RNAs externos (Park et al. 2004).

Além disso, um grande grupo de proteínas PR10 apresentam o motivo BET V1, que está relacionado a alergenicidade dessa família de proteínas (Bohle et al. 2003; Karlsson et al. 2004; Führer et al. 2022; Zhou et al. 2022). No entanto, nem todas as proteínas da família PR-10 foram identificadas como alergênicas (Aglas et al. 2020). O motivo Bet v1 já estava presente no último ancestral comum universal. No processo de evolução ocorreu a diversificação para inúmeras proteínas com baixa similaridade, mas conservando na sua estrutura, a dobra que confere capacidade de ligação a diversificados ligantes (Radauer et al. 2008).

As PR10 foram identificadas com papel importante nas respostas de defesa a microrganismos como vírus (Park et al. 2004), bactérias (Flores et al. 2002; Xie et al. 2010) e fungos (Chadha and Das 2006; Silva et al. 2013; Cai et al. 2018; Su et al. 2018), a nematoides (Andrade et al. 2010; Arraes et al. 2022; Li et al. 2022) e ao mesmo tempo a estresses abióticos (Hashimoto et al. 2004; Liu et al. 2006; Chen and Dai 2010; Agarwal and Agarwal 2014; Xu et al. 2014; Jain 2015; Sinha et al. 2020; Fang et al. 2022) Além disso, estão envolvidas no crescimento e desenvolvimento das plantas e são encontradas em diferentes tecidos e órgãos, vegetativos e reprodutivos. (Breiteneder et al. 1989; Zubini et al. 2009; Wu et al. 2017; Su et al. 2018). (Sinha et al. 2020) especulam que a atuação das PR10 no mecanismo de defesa a estresse bióticos esteja relacionada a

ativação de vias de sinalização de defesa e degradação do RNA dos patógenos invasores, contudo, ainda há muito a ser revelado sobre essa família de proteínas.

Na análise de expressão diferencial identificamos que enquanto os DEGs identificados no GS enriquecem o termo GO resposta a estresse biótico, os DEGs do GR enriquecem o termo resposta a estresse biótico. Em ambos casos esses DEGs são do tipo PR. No entanto, os DEGS do GR são proteínas do tipo PR10 homologas a Major allergen Pru ar1.

Com o objetivo de estudar a função de genes envolvidos nas respostas moleculares de plantas de cupuaçu a inoculação com *M. pernicioso*, foram escolhidos três genes de classes de moléculas importantes no processo: o fator de transcrição *TgERF9*, do gene que codifica para uma proteína semelhante a taumatina TLP1 (*TgPR5*) e do gene *TgPR10.1*

MATERIAL E MÉTODOS

Construção de plasmídeos e transformação das plantas

Os genes selecionados para este estudo foram sintetizados pela empresa Epoch Life Science Inc. (GS52674-6; Sugar Land, TX, USA), e foi adotado o uso de códons (codon usage) de *Arabidopsis thaliana*.

O T-DNA de cada um dos genes (*TgERF9*, *TgTLP1* e *TgPR10.1*) foi inserido no vector plasmidial PBI121 (Chen et al. 2003). Os genes de interesse são controlados pelo promotor do gene de actina *A. thaliana*. O gene repórter é o *gus* (β -glucoronidase) e o gene para seleção de plantas transformadas é o *nptII* (neomicina fosfotransferase), controlados pelos promotores dos genes CaMV 35S e *nos* (nopalina sintase), respectivamente.

Os plasmídeos, com cada um dos genes, foram inseridos em *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, como descrito por (Lacorte; Romano 2015).

A metodologia utilizada para transformação das plantas (MT) foi adaptada de diversos trabalhos (Dan et al. 2006; Sun et al. 2006; Pino et al. 2010) e está detalhadamente descrita em (Silva-Werneck et al. 2018).

Triagem de eventos transgênicos e análises de progênies

Os explantes que sobreviveram a seleção por Canamicina, no meio de regeneração, foram enraizados e posteriormente submetidos a ensaios histoquímicos com

GUS, de acordo com (Lacorte and Barros 2015). Posteriormente, as plantas foram aclimatadas em casa de vegetação e amostras de DNA dessas plantas foram extraídas utilizando o método CTAB (DOYLE and DOYLE 1987), modificado por (Romano and Leal-Bertioli 2015). A inserção do T-DNA no genoma foi confirmada via PCR e os primers utilizados foram: Act 2F 5'TGT CGT ACG TTG AAC AGA AAG C e SigPF 5'TGC CTT CAT TTC TTC TCT CT para genes alvos *TgERF9* (F 5'AACCTTGGCTTACAATCG/ R 5'TGGAGTTGAGTTGAGTATGG), *TgTLP1* (F - 5'GTC GTA CGT TGA ACA GAA AGC/R - 5'CAG CTA GTG TGT TGG GGG G e *TgPr10.1* (F - 5'TGTCGTACGTTGAACAGAAAGC/R - 5'AAGGTTGTCGGAATCAAGGA).

A seleção de plantas homozigotas recessivas foi feita aplicando canamicina (400 mg.mL⁻¹) sobre as folhas das mudas quando despontavam as duas primeiras folhas definitivas (15 dias após a sementeira). Para tanto, 60 sementes (T3) foram semeadas e testadas com Canamicina. Quando todas as mudas germinadas estavam resistentes ao antibiótico, a planta T2 foi considerada em homozigose.

Para identificação de segregação mendeliana, sementes da primeira geração (T1) foram germinadas em substrato Bioplant Plus para mudas (com fibra de coco e turfa Sphagnum) em casa de vegetação. A proporção de mudas resistentes/suscetíveis a canamicina foram determinadas. Os resultados foram utilizados para calcular o valor de qui-quadrado de Pearson e comparados com os valores críticos da distribuição de qui-quadrado (Upper-tail critical values of chi-square distribution), para um intervalo de confiança de 95%.

Quantificação do diferencial de expressão entre as linhagens

A diferença de expressão do gene em estudo, nas diferentes linhagens, foi realizada via RT-qPCR comparativa. Foram utilizados os primers para *TgERF9*: F - 5'AACCTTGGCTTACAATCG/ R- TGGAGTTGAGTTGAGTATGG, para *TgTLP1*: F- 5'GTT CCT ATG GAG TTC AGC/ R- 5'AAC CTA GAG AAG TTT GTG G e para *TgPr10.1*: F- 5'CAACCTTATCCCCAAGCTCA/R-TCCAGGGCATCGATTCTATT. A quantificação da expressão do gene de actina de MT (F- 5'GGT CCC TCT ATT GTC CAC AG/ R- 5'TGC ATC TCT GGT CCA GTA GGA) foi utilizada para normalização.

A extração de RNA total de Micro-Tom (T2) foi realizada com o *Kit PureLink Micro-to-Mid, Invitrogen*. O cDNA foi confeccionado com 1µg de RNA total, com transcriptase reversa (SuperScript® III, Invitrogen).

As reações de RT-qPCR foram realizadas com volume final de 20µL, utilizando o *Kit GoTaq® qPCR and RT-qPCR Systems, Promega*. As reações foram feitas na máquina Applied Biosystems 75000 fast, utilizando programa sugerido pelo software da máquina, que consiste em incubações iniciais a 50 °C por 2 min, 95 °C por 2 min e seguidas de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 30 s, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. Depois do 40º ciclo, a curva de dissociação foi realizada. As mudanças na expressão de genes selecionados foram calculadas como valores de quantidade relativa Log10 (RQ) usando o método Pfaffl $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl 2001).

Material biológico e Produção de inóculos

Os isolados dos fungos utilizados nos bioensaios, exceto *M. perniciosa*, estão depositados no banco de germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Identificação de cada fungo no banco e detalhes de coleta e transferência:

1) CEN 1536 - *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici* (raça 3), -isolado Fus-439, cedido pelo Dr. Ailton Reis – Embrapa Hortaliças, coletado em Paranapoã-SP, em 2017, substrato/hospedeiro de que foi coletado - caule de tomateiro por Dr Ailton Reis – Embrapa Hortaliças;

2) CEN 1537 - *Sclerotinia sclerotiorum* isolado CMES-1795, cedido pelo Dr. Giovanni Rodrigues Vianna – Embrapa-Cenargen, coletado em Palmeira-PR, em 02/04/2018, substrato/hospedeiro - haste de soja, Glycine max, coletado por Dra. Claudine Dinali Santos Seixas - Embrapa Soja.

3) CEN 1538 - *Verticillium dahliae* (raça 2), isolado Vert 65, coletado em Caçador-SC, 02/2005, substrato/hospedeiro de que foi coletado: tomate coletado por Dr. Ailton Reis – pesquisador da Embrapa Hortaliças.

Os basidiósporos de *M. perniciosa* Biotipo-S utilizados nos bioensaios foram coletados de vassouras de bruxa que desenvolvem em lobeiras infectadas (cultivadas no campus do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo-CENA/USP, Piracicaba-SP). Os esporos são conservados a -80 °C no tampão 16% glicerol; 0,01 M MES, pH 6,1; 0,01% Tween 20.

O inóculo inicial de *Verticillium dahliae* (raça 2), *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (raça 3) e *Sclerotinia sclerotiorum* foram produzidos após o reisolamento do fungo a partir de tomate MT, para garantia da virulência. O isolamento é feito cultivando o micélio em meio BDA (20% batata, 2% dextrose e 1,7% ágar) contendo cloranfenicol (25 mg. mL⁻¹), a 24 °C, por 7 dias.

Os inóculos para os bioensaios com folhas destacadas foram discos da borda do micélio cultivado em placa de Petri com meio BDA. Essa técnica foi utilizada para desafiar as plantas com *V. dahliae*, *S. sclerotiorum*.

Os esporos de *V. dahliae* e *F. oxysporum* utilizados nos bioensaios em mudas, em casa de vegetação, foram produzidos em sacos de polipropileno com filtro. O substrato utilizado foi grãos de arroz parboilizados hidratado (1mL.g⁻¹ /água:grama de arroz) e em seguida autoclavação (15 minutos, 121psi). A cada 50 gramas de grãos de arroz foram adicionados 7 discos de meio BDA (Ø 5 mm) colonizados pelo micélio. O material é incubado por 10 dias em BOD a 24°C, com fotoperíodo de 12 horas. A cada dois dias os grãos de arroz são manipulados para desfazer os grumos e misturar bem os micélios aos grãos de arroz. A separação dos esporos é feita suspendendo os grãos de arroz com 10 mL de Tween 80 0,05% por grama de arroz. Os grãos de arroz são separados da suspensão utilizando uma peneira.

Bioensaios em folhas destacadas

Três linhagens de tomate MT expressando *TgERF9* e quatro expressando *TgTLPI* e duas *TgPRI0.1* foram testadas para verificar resistência a *S. sclerotiorum* e *V. dahliae* raça 3, inoculando folhas destacadas da planta com micélio desses fungos. Foliolos de folhas completamente expandidas, mas ainda jovens, foram inoculados com *plugs* de 2 mm da borda de micélio de *S. sclerotiorum* e de 5 mm para *V. dahliae*. O inóculo de *S. sclerotiorum* foi colocado sobre a folha. O inóculo de *V. dahliae* foi colocado em contato com a extremidade do pecíolo. As folhas foram colocadas em placa de Petri sobre papel filtro umedecido para criar uma câmara úmida. O experimento foi conduzido em temperatura ambiente e local escuro. As folhas inoculadas com *S. sclerotiorum* foram fotografadas 48 horas após a inoculação (hai), quando inoculadas com *V. dahliae* as folhas foram fotografadas 4 dias após a inoculação (dai). As imagens foram utilizadas para estimar a área das lesões utilizando o software ImageJ (imagej.nih.gov/ij/). Plantas não transformadas foram utilizadas como controle.

Bioensaios com plantas em casa de vegetação

Linhagens de MT transformadas com os genes foram desafiadas com três fungos fitopatogênicos (*V. dahliae*, *Fusarium oxysporum* e *M. perniciosa*) em diferentes bioensaios em vaso e em casa de vegetação.

Para os bioensaios com *V. dahliae* e *F. oxysporum* a semeadura foi realizada em bandejas de células em polipropileno (12 mL). De 17 a 20 dias após a semeadura, as mudas foram retiradas das bandejas. O sistema radicular foi cortado, ficando com 2 cm, e mergulhado na suspensão de esporos (10^8 esporos mL⁻¹ em solução com detergente de Tween™ 80 Surfact-Amps™ a 0,05%) por 1 minuto. Depois de inoculadas, as mudas foram transplantadas para vasos com volume de 3L (4 mudas.vaso⁻¹). Cinco mL da suspensão de esporos foi vertida sobre o substrato, reforçando o inóculo. O substrato utilizado em cada vaso, foi na quantidade de 2 litros de solo tipo latossolo vermelho pasteurizado e um litro de substrato autoclavado hortiplant (turfa de sphagnum e fibra de coco).

Cerca de 20 dias após o transplante, a irrigação foi reduzida, até ser observado sinal de murcha. Procedimento repetido por um período de três semanas. Aproximadamente, 60 dias após o transplante, as plantas foram coletadas e avaliadas quanto ao comprimento do caule/altura, número e massa dos frutos. Ainda foi avaliada, com auxílio de lupa simples (aumento de 4x), a ocorrência do escurecimento dos tecidos internos do caule seccionado longitudinalmente na região da coroa.

Os bioensaios realizados com *M. perniciosa* foram conduzidos no CENA-USP (Centro de Energia Nuclear na Agricultura-Universidade de São Paulo). As mudas foram transferidas, aos 14 dias após a semeadura, para vasos de 150 mL com substrato PlantMax^{HT} + vermiculita expandida (1:1). Cinco dias após o transplante (DAT) foram inoculadas e mantidas em câmara de crescimento. A inoculação foi realizada aplicando 60 mL de basidiósporos nas regiões meristemáticas (gema apical e axilares). Após a inoculação, o ambiente foi mantido úmido (mais 90% de saturação) por 24 h, cobrindo as plantas com outro vaso de 150 mL semitranslúcido. As plantas foram avaliadas medindo o engrossamento da haste principal - diâmetro (5, 15, 25 e 35 DAT) e altura da planta (5, 15, e 25 DAT).

Análise estatística

Os dados gerados com bioensaios em casa de vegetação, com plantas não inoculadas e inoculadas com *Verticillium* ou *Fusarium* foram feitos com quatro plantas por vaso. Sendo assim, para identificar o grau de dependência entre as plantas amostradas nos vasos foi utilizado a análise de ICC (*intraclass correlation coefficient*). Considerando que houve correlação interclasse (correlação entre as plantas de cada vaso) foi utilizado a técnica de equações estimadas generalizadas (*generalized estimating equations* – GEE), um modelo que considera multiníveis (Finch et al. 2014; Shoukri 2018).

Desta forma, foi construído um modelo GEE de família gaussiana e estrutura de correlação “*exchangeable*” para os dados da amostra de altura da planta e massa de frutos. Para a variável “número de frutos” foi utilizado um modelo GEE de família Poisson. Em seguida foram realizadas algumas comparações múltiplas com ajuste de Holm.

Os dados gerados com os bioensaios desafiando as plantas com *M. perniciosa* foram comparados via ANOVA. Pelo critério de AIC, AICc e BIC, o modelo escolhido foi o aditivo ‘completo’ (com interação entre Linhagens e tratamento). O modelo aditivo ‘completo’ $Y \sim G + T + G*T$ que parece ser representativo dos dados da amostra (foi selecionado em função dos resultados da análise de resíduos. Como os dados estavam desbalanceados, o procedimento de comparação múltipla entre os tratamentos foi realizado conforme o procedimento descrito por Herberich et al. (Herberich et al. 2010). Em todas as análises foi considerado um intervalo de confiança de 95%.

Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* foi realizada com base em (DUSI 2015), conforme descrito por (Falcão et al. 2019). Ponta de galhos, região da gema apical (em torno de 1 cm), de árvores de *T. grandiflorum* dos genótipos 174 (resistente) e 1074 (suscetível), inoculadas e não inoculadas com *M. perniciosa* foram analisadas. A coleta do material foi realizada 8 h após a inoculação com 30 μL de basidiósporos de (10^{-6} . μL^{-1}) e em seguida fixado em FAA (1,8% (v/v) formaldeído, 60% (v/v) etanol, 5% (v/v) ácido acético) por 24 h. Após a transferência para etanol 70%, a região meristemática apical das gemas foi isolada e o excesso de tricomas removido. O material foi então desidratado, transferido gradativamente para HistoChoice® (Sigma Life Science) e progressivamente embebido em Paraplast®. Seções de 12 μm foram obtidas e colocadas e coladas em lâminas de vidro microscópicas tratadas com organossilano. O Paraplast® foi removido com HistoChoice® e as lâminas utilizadas para hibridização *in situ*. Um fragmento de 140 pb de *TgPR10.1*, clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega) foi utilizado como molde para

transcrever as sondas sense e antisense usando DIG RNA labeling kit (Roche) de acordo com as instruções do fabricante. Uma concentração de sonda em tampão de hibridização [50% formamida, 1X solução de Denhardt, 0,6 ng.µL⁻¹ tRNA, 300 mM NaCl, 10% sulfato de dextrano, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) e 1 mM EDTA (pH 8,0) em água]. A hibridização ocorreu a 42 °C no escuro dentro do forno de hibridização “In Slide Out”, modelo 241000 (Boeckel Scientific). Após 18 h, os cortes foram bloqueados por 30 min em 1% de reagente de bloqueio no tampão 1 (0,15 M NaCl em 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5). As lâminas foram incubadas com fragmentos Fab anti-digoxigenina-AP (Roche) diluídos 1:1000 no tampão 1 por 2 h e depois lavadas duas vezes por 15 min no tampão 1. Os cortes foram transferidos para o tampão 3 (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 contendo 0,1 M NaCl e 0,05 M MgCl₂; pH final ajustado para 9,5) por 5 min antes da coloração em 1:50 NBT/BCIP – Roche: tampão 3 por 16 h. As lâminas foram lavadas em tampão 4 (0,01 M Tris-HCl, pH 8,0, contendo 1 mM EDTA) e as lâminas montadas em 50% (v/v) de glicerol. As lâminas foram observadas em estéreomicroscópio Zeiss e Axiophot (Zeiss). A cor roxa indica o local de hibridização.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de avaliar a ação dos genes *TgERF9*, *TgTLP1* e *TgPR10.1* *in planta*, tomates Micro-Tom foram transformados com os respectivos genes, gerando as linhagens denominadas MT_*TgERF9*, MT_*TgTLP1*, MT *TgPR10.1* em homozigose para cada um dos genes. Para o estudo foram selecionadas aquelas linhagens com padrão mendeliano (3:1) de segregação, exceto uma delas (MT_*TgPR10.1_2*). As linhagens que apresentavam maior expressão do gene de interesse também foram priorizadas no estudo.

A análise comparativa da expressão foi feita via RT-qPCR. 3 linhagens MT_*TgERF9* apresentaram nível similar de expressão; duas MT_*TgTLP1* (11 e 13) apresentam maior nível de expressão que as demais (8 e 5B); as duas linhagens MT_*TgPR10.1* apresentaram nível similar de expressão.

Para avaliação do potencial papel antifúngico dos genes em estudo, ou envolvimento destes nos mecanismos de resistência e susceptibilidade a doença, as linhagens foram testadas contra diversos fitopatógenos: *S. sclerotiorum* e *V. dahliae*, *F. oxysporum* e *M. perniciosa*.

Bioensaios em folhas destacadas com *S. sclerotiorum*

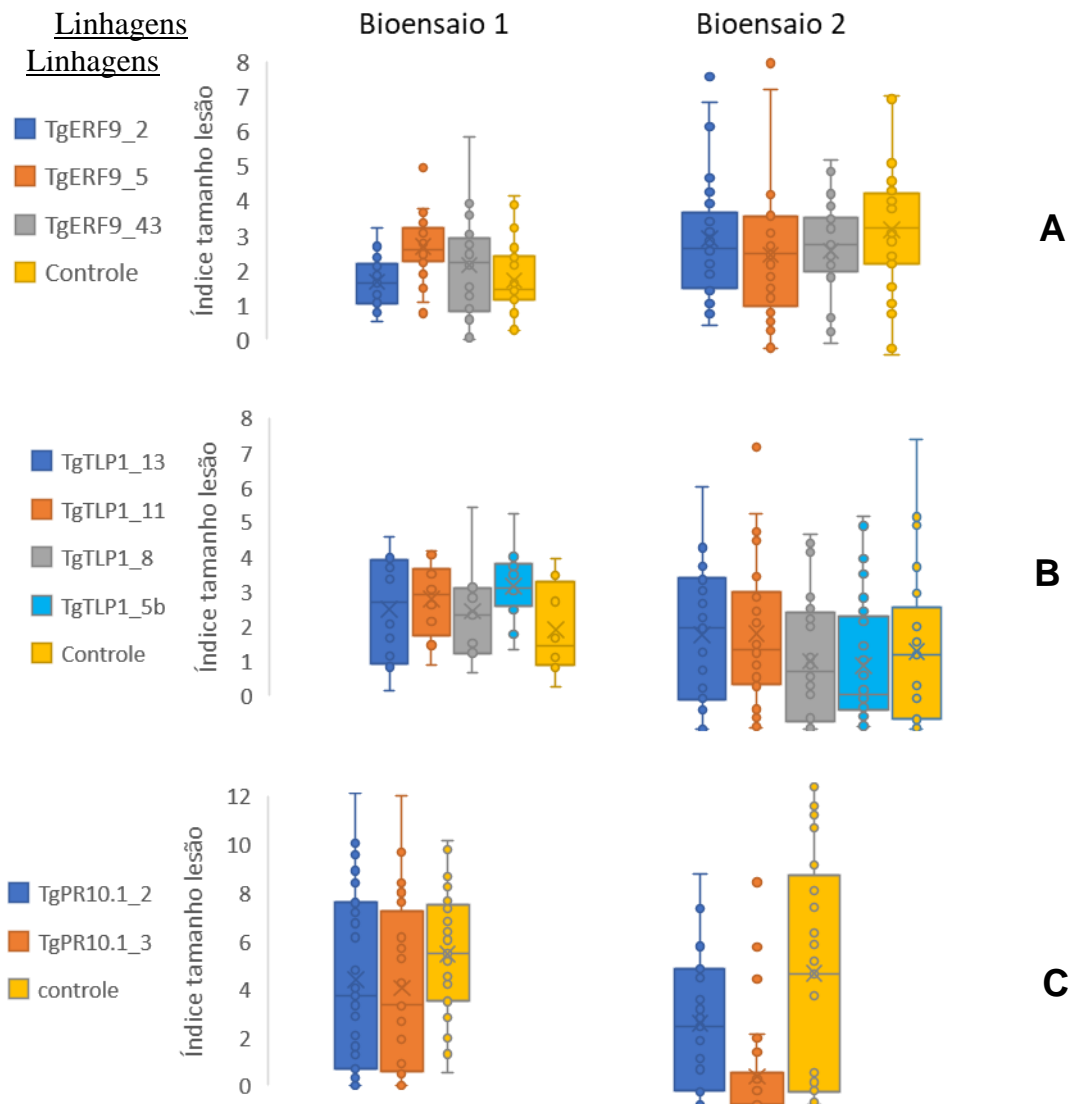


Figura 3- Lesões causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em folhas destacadas de linhagens de Micro-Tom transformadas com genes *TgERF9* (A), *TgTLP1* (B) e *TgPR10.1* (C). Os gráficos tipo Box plot mostramos valores do tamanho da lesão induzida pelos isolados em cada linhagem. A linha horizontal dentro de cada caixa representa a mediana. Controle = Plantas não transformadas.

Os dados gerados com os bioensaios em folhas destacadas, inoculadas com *S. sclerotiorum*, mostram que as plantas expressando os transgenes *TgERF9* e *TgTLP1* apresentam resultados similares as plantas não transformadas (figura 3A e B). Já nas plantas transformadas com *TgPR10.1* (figura 3C), o fungo se desenvolve mais lentamente na linhagem 3.

Além disso, foi observado que nas folhas completamente necrosadas ocorre o crescimento de micélio sobre toda a superfície da placa incluindo folhas e o papel filtro

com formação de esclerócios. Por outro lado, nas plantas MT_TgPR10.1_3, o micélio era menos denso sobre as folhas, crescendo preferencialmente sobre o papel filtro, evitando a folha. Isso pode ser confirmado com a formação de esclerócios majoritariamente sobre o papel filtro (dados não mostrados). Os resultados indicam um que a *tgPR10.1* pode estar envolvida na reposta de defesa, diminuindo a susceptibilidade da planta a *S. sclerotiorum*. Este achado está em acordo com os resultados obtidos em outras plantas. Garg et al. (2013) relataram diferenças no perfil proteômico entre genótipos resistentes (GR) e suscetíveis (GS) de *Brassica Napus*, infectados com *S. sclerotiorum*. Foi identificado um aumento de expressão de 8,5 vezes, em 12 hai, no GR, e uma diminuição de duas vezes no GS de uma proteína da família PR10, uma MLP (major látex-related protein) (Garg et al. 2013). Além disso, foi observado em bioensaios *in vitro*, que uma PR10 de milho apresentou atividade antifúngica contra esse fungo (Zandvakili et al. 2017). O mecanismo de ação pode estar relacionado com a capacidade da PR10 de penetrar nos fungos. Testes *in vitro* mostraram que uma PR10 de *T. cacao* purificada, que apresentou atividade como ribonuclease e atividade antifúngica contra *M. perniciosa* e leveduras, foi capaz de entrar nas células do fungo e da levedura (Pungartnik et al. 2009).

Bioensaios em folhas destacadas com *V. dahliae*

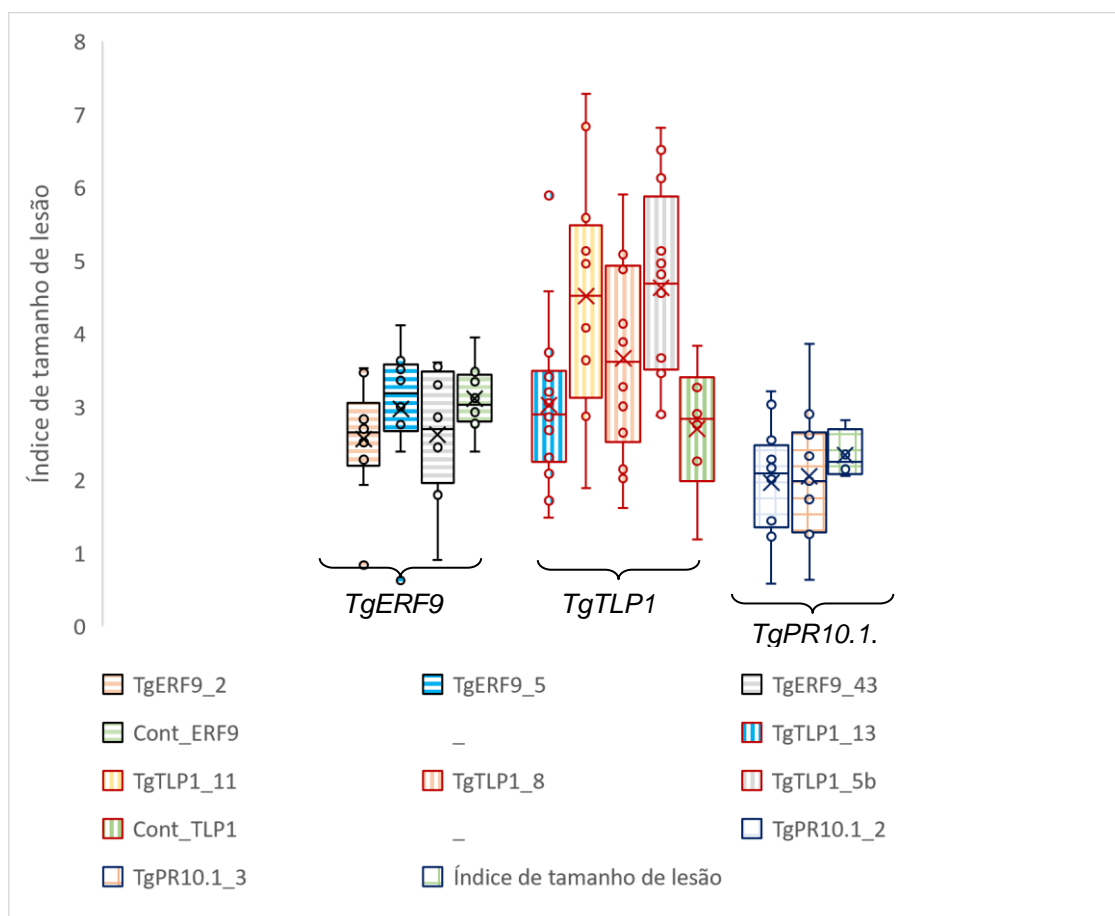


Figura 4- Lesões causadas pelo fungo hemibiotrófico, *Verticillium dahliae* raça 2, em folhas destacadas de linhagens de tomate Micro-Tom transformadas com genes *TgERF9*, *TgTLP1* e *TgPR10.1*. Os gráficos tipo Box plot mostram o intervalo do tamanho da lesão induzida pelos isolados em cada linhagem. A linha horizontal dentro de cada caixa representa a mediana. Cont_ = controle não inoculado.

Não foi observada diferença para o tamanho da lesão geradas por *V. dahliae* nas folhas destacadas de três linhagens de MT expressando o fator de transcrição *TgERF9*. Já os dados gerados com plantas expressando o gene *TgTLP1* indicam uma tendência a ocorrência de um maior número de lesões com tamanho acima da média verificada nas plantas não transformadas. Nas plantas expressando o gene *TgPR10.1* foi observada uma tendência a formação de lesões menores que as que ocorrem nas plantas não transformadas (figura 4).

Bioensaios com *V. dahliae* em casa de vegetação

Para confirmar os resultados obtidos com os ensaios em folhas destacadas, bioensaios mais próximos das condições reais de cultivo foram conduzidos em casa de vegetação. Mudanças de MT transformadas foram inoculadas, conforme descrito em materiais e métodos, com esporos de *V. dahliae* e cultivadas até 60 dai, período em que as plantas já completam o ciclo, ou seja, já estão com parte dos frutos maduros (figura 3). A infecção das plantas inoculadas foi confirmada através de um dos sintomas típicos da infecção, o escurecimento da parte interna do caule.

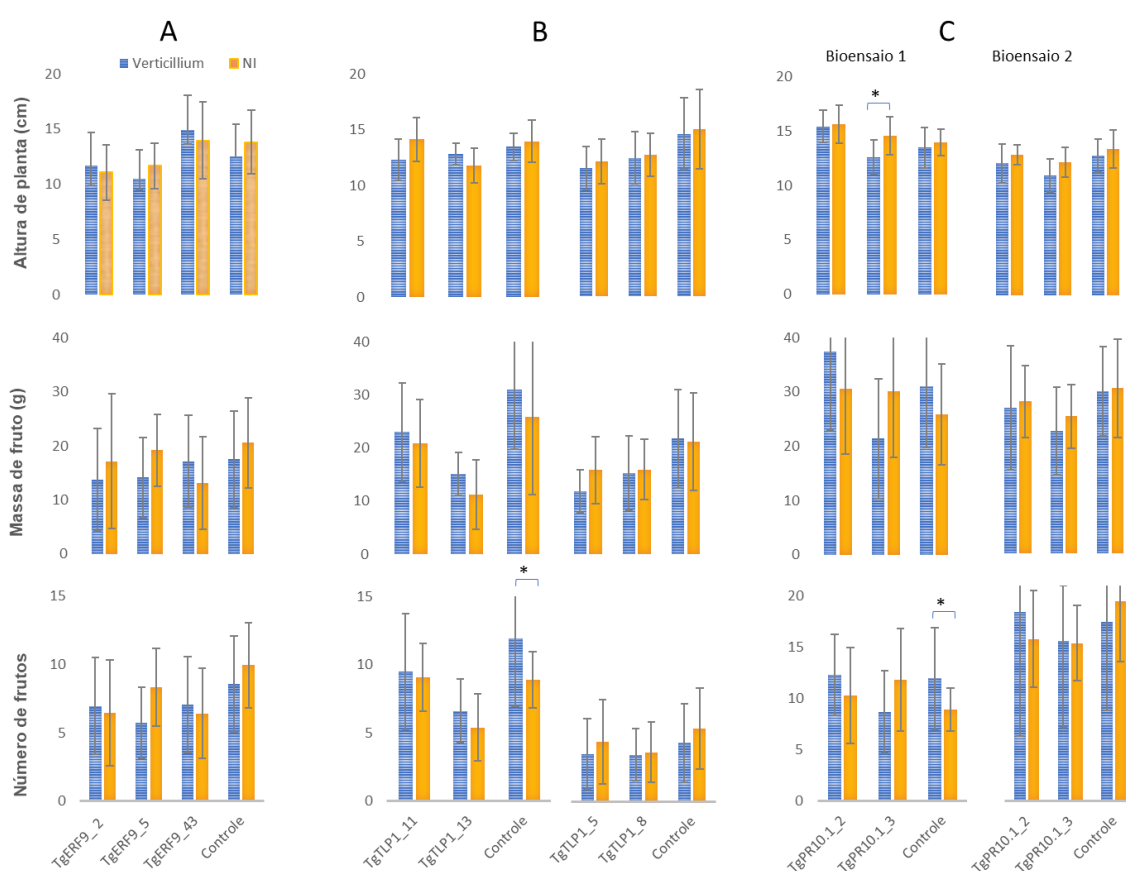


Figura 5- Avaliação dos efeitos da infecção por *Verticillium dahliae* raça 2 em plantas de Micro-Tom transformadas com genes os *TgERF9*, *TgTLP1* e *TgPR10.1*. Bioensaio realizado com mudas da geração T3 em homozigose, cultivadas em vaso. Para as plantas de MT_*TgERF9* (A) foi feito um bioensaio com três linhagens; para MT_*TgTLP1* (B) um bioensaio em dois blocos diferentes com 4 linhagens; para MT_*TgPR10.1*(C) foram feitos dois bioensaios com duas linhagens. Controle=Planta não transformada e desafiada

Não foi observada redução de altura de plantas em função da infecção por *V. dahliae*. Além disso, não foram observadas lesões típicas causadas nas folhas de tomate por *Verticillium* [lesão em formato de “V” na borda das folhas (Fradin and Thomma 2006)]. No entanto, a produção e o número de frutos tendem a ser reduzidos nas plantas transformadas *TgERF9* e *TgTLPI*, o que não acontece com as MT_TgPR10.1 (figura 5). Ainda que estatisticamente não haja diferenças entre plantas transformadas e não transformadas, observamos uma tendência que confirma o observado com os bioensaios com folhas destacadas. O fato do isolado utilizado não causar os sintomas típicos da doença pode estar dificultando a avaliação do efeito da superexpressão desses genes. O isolado de *V. dahliae* utilizado nesse trabalho é capaz de causar a doença com sintomas como a murcha e lesões nas folhas na variedade de tomate Santa Cruz. Uma alternativa para definir melhor o efeito da superexpressão desses genes em tomate seria, via cruzamento, transferir esses transgenes para uma variedade mais suscetível a *V. dahliae* e outros, como Santa Cruz ou Ponderosa (Reis et al. 2004).

Tem sido descrito uma vasta gama de proteínas de plantas relacionada a defesa com envolvimento no processo de resistência a *V. dahliae*. Entre elas está uma PR10 do grupo da MLPs de algodão (*Gossypium hirsutum*), a GhMLP28 (Yang et al. 2015). Também em algodão, uma PR10.1 apresenta expressão aumentada em resposta a infecção na espécie de algodão resistente (*G. barbadense*), (Chen et al. 2013). Em morango foram identificadas proteínas da família PR10.1 com expressão aumentada em plantas resistentes quando inoculadas com *V. dahliae*, mas nem todas as isoformas de PR10.1 respondem a infecção por *Verticillium* (Besbes et al. 2019).

Proteínas tipo taumatina de algodão (GbTLp1) estão listadas entre as proteínas envolvidas na resistência a murcha de *verticillium* (Munis et al. 2010). No entanto, a *TgTLPI* estudada nesse trabalho tende a aumentar a suscetibilidade.

A superexpressão de ERF9 em *Arabidopsis* reduziu a transcrição de *pdf 1* (Maruyama et al. 2013) e de *PRI* (Camehl and Oelmüller 2010). No entanto, a expressão de *TgERF9* em MT não aumentou a suscetibilidade da planta a *V. dahliae*. Provavelmente, devido a presença de outros fatores de resistência presentes em MT.

Em tomate foi identificada uma proteína tipo receptoras, Ve, que contém uma região extra celular rica em repetições de leucina, que apresenta resistência a raça 1 especificamente (Gayoso et al. 2010). Essa proteína e suas interações foram bem estudadas e muitos detalhes são conhecidos. Homólogos desses genes são encontrados em muitas outras espécies (Chen et al. 2016; Song et al. 2020). Dois homólogos

encontrados em algodão (Gbvd3 and Gbvd6) quando superexpressos em *Arabidopsis* aumentam a expressão de genes da via ácido jasmônico/Etileno (ERF1, PR3 e PDF1), da via de ácido salicílico (PR1e PR2 e o regulador de etileno GST2) e ROS e acúmulo de calose na fase inicial da infecção (Chen et al. 2016).

Bioensaios com *F. oxysporum* em casa de vegetação

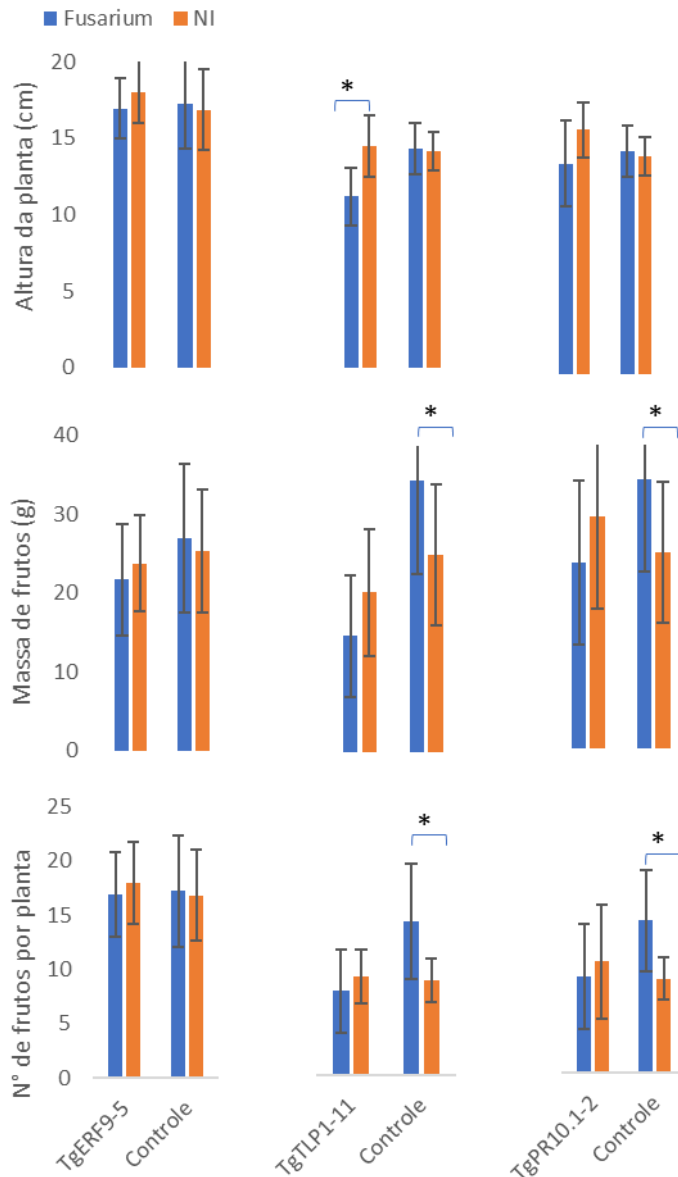


Figura 6- Avaliação dos efeitos da infecção por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopesci* raça 3 em plantas de Micro-Tom transformadas com genes os *TgERF9*, *TgTLP1* e *TgPR10.1*. Controle= Planta não transformada.

As plantas inoculadas com *Fusarium* não apresentaram sintomas típicos de murcha e lesões foliares, ainda que tenha sido observado um leve escurecimento dos tecidos no interior do caule das plantas. A maioria das variedades de tomate atualmente comercializadas, tem incorporada boa resistência a infecção por *Fusarium*. MT também apresenta resistência a 1, 2 e 3 raças (Takahashi et al. 2005). Nos bioensaios com MT-TLP1 e MT-PR10.1 ocorreu uma doença fúngica chamada cercosporiose (confirmada via análise microscópica dos corpos de frutificação), que causou lesões nas folhas mais velhas, quando os frutos começaram a se desenvolver. As plantas não transformadas inoculadas com *Fusarium* apresentaram melhor desempenho que as não inoculadas (figura 6). Isso pode ter ocorrido devido a resposta hipersensibilidade disparada pela presença do *Fusarium*.

F. oxysporum é uma espécie de fungo que está amplamente distribuída pelo mundo e pode causar as doenças murcha de fusarium e podridão de raiz, numa ampla gama de espécies, bem como colonizar plantas como um endofítico ou epifítico (Ambele et al. 2020).

Neste trabalho, os bioensaios para desafiar as plantas superexpressando os genes de cupuaçu tiveram o objetivo de compreender a função desses genes, não de busca de resistência a *Fusarium*.

A doença murcha de fusarium apresenta sintomas como murcha durante o dia, crescimento atrofiado e clorose foliar e escurecimento dos tecidos vasculares. Os conidiósporos que estão no solo germinam e as hifas que desenvolvem penetram nas células epidérmicas das raízes. Ferimentos como os provocados por fitonematóides facilitam a infecção. Contudo as hifas desse fungo produzem enzimas que degradam a parede celular, como cutinase e pectinase e poligalacturonase, para auxiliar na penetração (Mendgen et al. 1996).

As plantas de Micro-Tom não transformadas e as transformadas com gene de cupuaçu, que estão sendo estudados neste trabalho, apresentaram o sintoma de mudança de cor da parte interna da base do caule, mas não foi observado sintomas de murcha. O desenvolvimento e a produção de frutos não foi afetada pela infecção das plantas por *F. oxysporum f.sp lycopersici* raça 3 nas plantas transformadas. Pelo contrário, em um dos bioensaios, as plantas não transformadas inoculadas, apresentaram melhor desempenho (maior produção de frutos) que as não inoculadas e que as transformadas das linhagens dos três genes em estudo. É possível que nas plantas não transformadas o fungo tenha se estabelecido como um endofítico. Essa resposta foi mais evidente no bioensaio em que

as folhas mais velhas, quando as plantas estavam na fase reprodutiva, foram atacadas por outro fungo causador da doença cercosporiose.

Esse resultado inesperado, indica que o isolado utilizado está se comportando como um fungo endofítico na variedade Micro-Tom, e além disso, demonstra que os genes *TgPR10.1* e *TgTLP1* podem ter afetado a colonização da planta pelo fusarium. No entanto, para confirmar essa hipótese é preciso repetir os bioensaios, avaliar o isolado e a colonização das plantas.

Os isolados que não são fitopatogênicos, normalmente, não se alastram pelas plantas, só colonizam as raízes, chegando à base do caule no máximo. No entanto, ainda assim conseguem ativar o sistema de defesa das plantas e conferir resistência aos isolados patogênicos dessa mesma espécie e de outras (Lamo et al. 2021). O mecanismo de indução de resposta de defesa ativado por endofíticos da espécie *F. oxysporum* parece ser independente de PTI e das principais vias de sinalização por JA/ET ou SA ou ABA, contudo ainda há muitas lacunas na compreensão desse mecanismo (Lamo et al. 2021).

Bioensaios com *M. perniciosa* em casa de vegetação

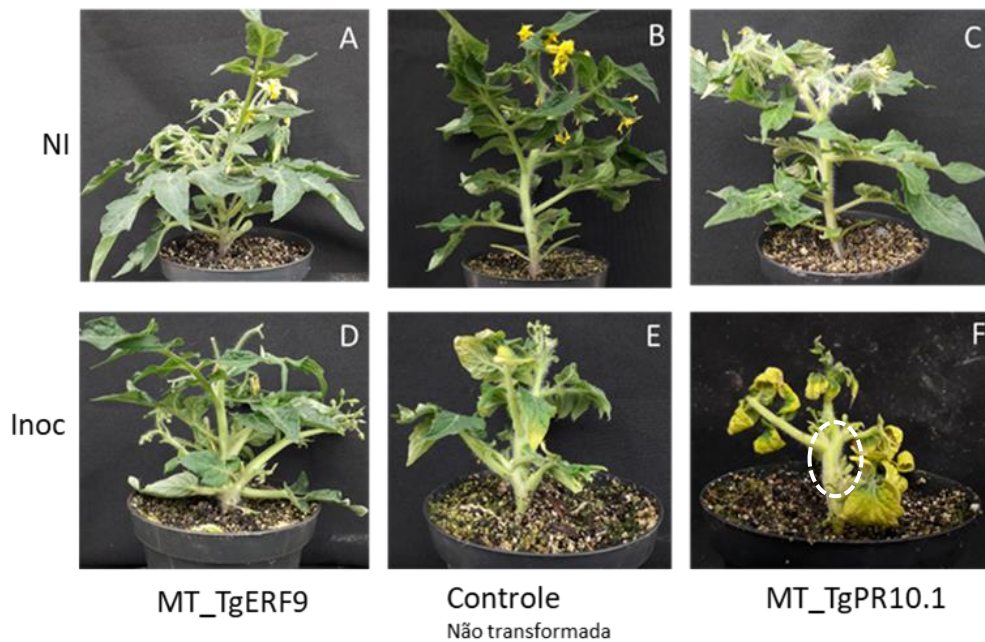
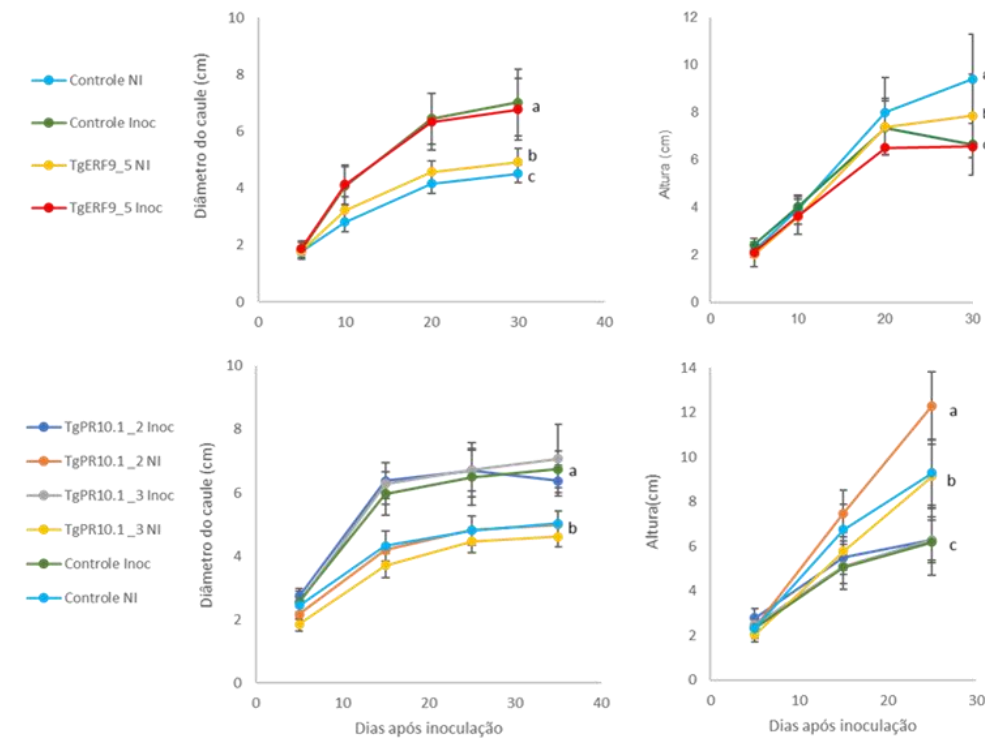


Figura 7- Plantas de MT_TgPR10.1 e TgERF9 desafiadas com *M. perniciosa*. i) Gráficos referentes às análises de altura e diâmetro do caule. “a, b e c” indicam as diferenças de diâmetro e altura entre os tratamentos via análise comparativa-Anova, com 95% de confiabilidade. ii) Plantas de MT desafiadas A) MT_TgERF9 não inoculado (NI) B) Controle (MT-Não transformada- NI) C) MT_TgPR10.1- NI D) MT_TgERF9- Inoculado

(Inoc) E) Controle (MT-Não transformada) - Inoculada F) MT_TgPR10.1- Inoculada. O círculo branco destaca o sintoma típico de engrossamento do caule na vassoura de bruxa em tomate.

As plantas superexpressando *TgERF9* parecem sentir menos os efeitos da VB. Observa-se que a alteração do diâmetro do caule e da altura da planta acontece em menor proporção em MT_TgERF9, que nas plantas não transformadas, mais claramente aos 30 dai (figura 7). A vassoura de bruxa causa hiperplasia dos tecidos infectados, que em MT inoculado resulta em aumento do diâmetro do caule. A VB, também induz o desenvolvimento precoce dos brotos laterais e enfraquece a planta, o que resulta em menor altura (Deganello et al. 2014b). Dados de clorose e produção de frutos estão sendo coletados para reforçar os indícios gerados com dados de diâmetro de caule e altura de planta.

ERF9 diminui expressão de PR1 (Camehl and Oelmüller 2010), que parece ser importante no patossistema *Theobroma-M. perniciosa*, uma vez que o próprio fungo produz esse tipo de proteína (Teixeira et al. 2012; Vasconcelos et al. 2021). No entanto, no estudo de transcriptoma apresentado no capítulo I dessa tese (Falcão et al. 2022), a expressão de *PR1* aumentou, concomitantemente com o aumento da expressão de ERF9 (100x) no GR, 48 hai. Também foi demonstrado que em *Pocirus trifoliata* esse FT está envolvido na remoção ROS das células da planta (Zhang et al. 2022). O que pode estar relacionado ao efeito de VB (menor aumento de diâmetro, menor redução na altura) em MT_TgERF9.

Além disso, estudos mais aprofundados como silenciamento desse gene em cupuaçu ou cacau (talvez em células de calos que são infectadas por *M. perniciosa* fosse um modelo com repostas mais efetivas. O sequenciamento do transcriptomas de plantas superexpressando *TgERF9* auxiliaria a entender a função desse fator de transcrição.

Em ambientes tropicais e em árvores a comunidade endofíticas assume um papel ainda mais importante que em culturas anuais (Arnold and Lutzoni 2007). Avaliar se a colonização por fungos e bactérias endofíticos é afetada pela superexpressão de *TgERF9*, mesmo que por uma espécie de bactéria, como *Bacillus subtilis* e uma espécie de fungo (trichoderma), traria informações valiosas sobre a função desse gene no patossistema *M. perniciosa_Theobroma* (Vadassery et al. 2008; Camehl and Oelmüller 2010).

As plantas de Micro-Tom superexpressando os genes de cupuaçu *TgPR10.1* desafiadas com *M. perniciosa* biótipo S não apresentaram melhor desempenho que as não

transformadas, quanto a resistência a vassoura de bruxa, apresentando o sintoma característico de aumento do diâmetro do caule e diminuição de altura (figura 7).

Várias proteínas da família PR10 relacionam-se a atividade de ribonuclease e atividade antifúngica, sendo que há fortes indícios de que uma esteja relacionada a outra (Fernandes et al. 2013; Sinha et al. 2020). Muitas proteínas da família PR10 são ligantes de fitohormônios, especialmente citocininas (Srivastava et al. 2006; Fernandes et al. 2008, 2009) que estão envolvidas na ocorrência da vassoura de bruxa. Plantas modelo MT superexpressando o gene *Arabidopsis* citocinina oxidase-2 (35S::AtCKX2), que codifica para desidrogenases/ oxidases que degradam citocininas, resultou em uma redução na incidência da doença e no diâmetro do caule (Costa et al. 2021).

Pungartnik e cols. (2009) estudou atividade de uma PR10 de cacau observou que atividade antifúngica dessa proteína estava relacionada com a entrada da mesma nas hifas ou em células de leveduras. Testes de triagem em leveduras mutantes mostrou que leveduras com mutações em genes que codificam para proteínas de transporte com alta afinidade a cobre eram resistentes a ação da TcPR10. E que a entrada dessa proteína nas células era dependente da proteína permease Snq2 (Pungartnik et al. 2009). Essa informação conjuntamente com o fato de que proteínas PR10 típicas são intracelulares (Lebel et al. 2010; Li et al. 2022) e que, na fase biotrófica, o fungo *M. pernicioso* permanece na região intercelular, é compreensível que a infecção induzida por uma grande quantidade de esporos não seja afetada de forma direta (degradação de RNA ou DNA) pela *TgPR10.1*. No entanto, a atividade de ligante a fitohormônios e outras substâncias poderia afetar o ambiente molecular (Morris et al. 2021).

A análise do diferencial de expressão de genes de cupuaçu nas primeiras 48 h de gemas apicais de galhos de cupuaçu mostrou que tanto no genótipo resistente (GR) quanto no sensível (GS) há um aumento na expressão de genes da família das PR10. No entanto, no GR o número de DEGs de homólogos a PR10 Major allergen Pru ar 1 era maior, sendo que essas proteínas enriqueceram de forma significativa o termo GO de resposta a estresse biótico, enquanto que no GS isso não aconteceu. Em GS os DEGs enriqueceram significativamente o termo GO - resposta a estresse abiótico (capítulo I). Contudo, na análise de diferencial de expressão apresentada no capítulo I, a quantidade de transcritos que codificam para essa TgPr10.1 foi pouco alterada.

A superexpressão de TgPR10.1 em MT afetou a altura das plantas. Tendo em vista que proteínas da família PR10 são conhecidas como ligantes de fitohormônios, outros bioensaios foram feitos para investigar melhor esse fato (figura - 8).

Efeito de *TgPR10.1* na altura de tomate Micro-Tom

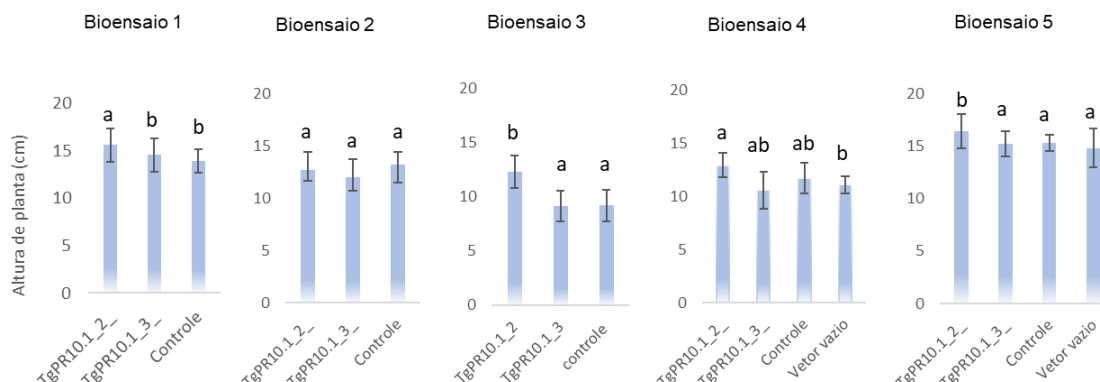


Figura 8 – Efeito da superexpressão de *TgPR10.1* em tomate variedade Micro-Tom na altura de plantas. As letras “a, b e c” são referentes as diferenças de altura entre os tratamentos, que foram avaliadas via análise comparativa-Anova, com 95% de confiabilidade.

Plantas das linhagens *TgPR10.1* foram cultivadas em dois tipos de substrato, onde o solo vermelho foi substituído por vermiculita. Plantas transformadas com vetor vazio e plantas não transformadas foram cultivadas como controle.

As medidas de altura de plantas transformadas com *TgPR10.1* demonstram que a superexpressão desse gene pode alterar a altura das plantas. O resultado da RT-qPCR mostra que não há diferença significativa na expressão do transgene entre as duas linhagens, em T2. No entanto, as linhagens não se comportam da mesma maneira. A linhagem *TgPR10.1_2* apresenta plantas mais altas.

Estudos anteriores demonstraram a alteração na altura de plantas devido a alteração de expressão de genes da família das PR10. Li, 2020 identificou que mutações alvos de CRISPR/CAS9 em genes de arroz (*Oriza sativum*) da família das PR10, do grupo BET v1, resultaram em plantas com altura menor.

A principal hipótese para justificar a mudança na altura de plantas pela superexpressão de *TgPR10.1* é a possibilidade dessa proteína estar interferindo na disponibilidade de citocinina, em função da atividade de ligação e armazenamento de citocininas das proteínas PR10 (Fernandes et al. 2008; Zubini et al. 2009; Aglas et al. 2020; Morris et al. 2021). Srivastaca e cols estudando uma PR10 (proteína responsiva a ácido abscísico-ABRA17 ou PR10.4) de ervilha, demonstrou que a superexpressão desse gene em *A. thaliana* gera mudas mais altas. Medidas de concentração e quantificação de transcritos do gene *ARR5* - gene responsivo diretamente à presença do fitohormônio

citocinina comprovam o envolvimento desse hormônio no aumento da altura das plantas transformadas (Srivastava et al. 2006).

Para obter mais indicativos sobre a função desta proteína em cupuaçuzeiro, foi realizado um estudo de localização da expressão do gene *TgPR10.1* em ponta de galhos.

Localização de transcritos de *TgPR10.1* na ponta de galhos de *T. grandiflorum*

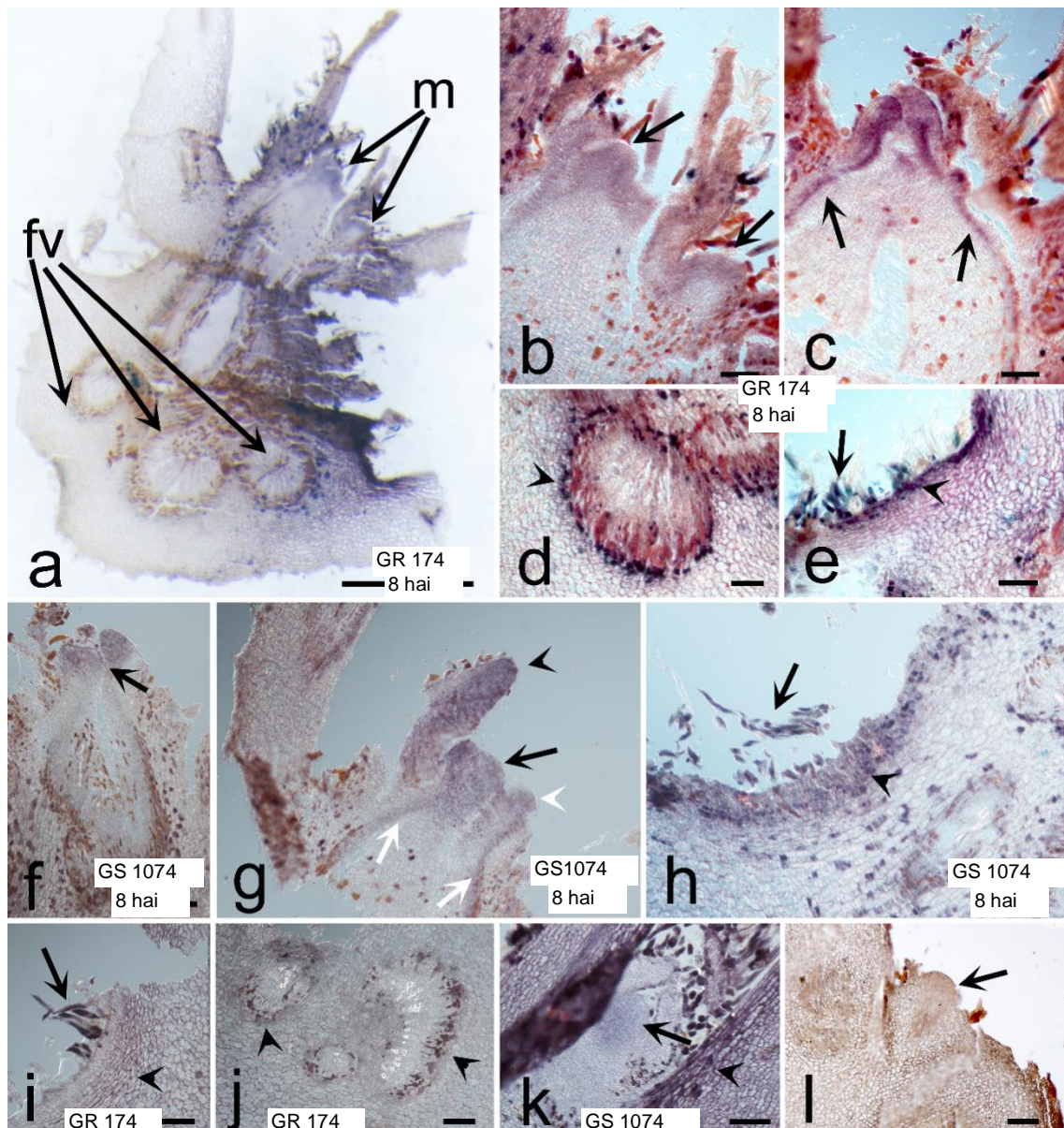


Figura 9 – Localização via Hibridização *in situ* dos transcritos de *TgPR10.1* expressos nos tecidos próximos e dos que compõe a gema apical de galhos de árvore de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*). **a-e, i-j, l)** genótipo resistente ; m= meristema

fv= feixe vascular **f- h, k** genótipo suscetível 1074; **a-h** 8 horas após a inoculação com *Moniliophthora perniciosa*; **i-k** tecidos não inoculados- uma seção longitudinal de uma região de meristema apical mostrando dois meristemas e feixes vasculares; **b**) detalhe de dois meristemas mostrando forte sinal de hibridização (setas); **c**) detalhe da região do meristema mostrando alto sinal no procâmbio (setas); **d**) detalhe do tecido com expressão em células ao redor da ponta de seta do feixe vascular; **e**) detalhe da superfície foliar mostrando tricomas com sinal de hibridização (setas) e células na superfície foliar (cabeça de seta); **f**) corte longitudinal de uma região de meristema apical mostrando o meristema (seta); **g**) detalhe da região do meristema com sinal de ISH no meristema (seta preta), folhas jovens (pontas de setas) e procâmbio (setas brancas); **h**) detalhe de folha com sinal nas células da superfície (ponta de seta) e nos tricomas (seta); **i**) Sinal forte nos tricomas (seta) e menos sinal nas células próximas à superfície; **j**) forte sinal nas células ao redor dos feixes vasculares; **k**) sinal nas células do meristema (seta) e na superfície da folha – epiderme (seta); l) hibridização com fita de DNA senso. Barras de escala = 500 µm (**a**), 100 µm (**b - i, k - l**), 40 µm (**j**)

Oito horas após a inoculação das gemas apicais de galhos de árvores de cupuaçuzeiro com *M. perniciosa*, o GR 174 apresentou forte sinal de hibridação *in situ* (Fig. 7a), especialmente nos meristemas (Fig. 7b), procâmbio (Fig. 7c), nas células que circundam o feixe vascular (Fig. 7d) e nos tricomas e na superfície (epiderme) das folhas (Fig. 7e). O GS 1074, 8 hai, apresentou sinal na parte superior da gema apical (Fig. 7f) mais especificamente no meristema, folhas jovens e procâmbio, mas também nos tricomas e na superfície das folhas (epiderme) (Fig. 7h). Os tecidos dos GR 174 (Fig. 7i, j) e GS 1074 (Fig. 7k) não inoculados apresentaram sinal de hibridização nos tricomas, células ao redor dos feixes vasculares, meristema e células na superfície das folhas (epiderme). Os controles da fita de RNA no sentido senso não apresentaram sinal.

O padrão de expressão de *TgPR10.1* foi o mesmo em ambos os genótipos e estão de acordo com os dados do RT-qPCR de que a expressão do gene *TgPR10.1* está presente nas plantas que não foram expostas ao fungo, indicando uma função dessa proteína no desenvolvimento das folhas e da gema apical. A presença destes transcritos, particularmente no procâmbio, indica um papel desta PR no desenvolvimento e crescimento da planta, o qual é afetado por citocininas, fitohormônios reguladores centrais da atividade cambial (Matsumoto-Kitano et al. 2008; Riefler et al. 2022). Este dado reforça o potencial papel da *TgPR10.1* ao crescimento vegetal através de interação com este fitohormônio. Considerando-se que no desenvolvimento da vassoura de bruxa, a hiperplasia e hipertrofia de tecidos são sintomas típicos da doença, o envolvimento deste gene no processo é relevante.

CONCLUSÃO

A avaliação dos genes *TgERF9*, *TgTLP1* e *TgPR10.1* pela expressão em tomate MT e desafio com patógenos, revelou o efeito de cada um deles *in planta*. Os genes *TgERF9* e *TgTLP1* parecem interferir na produtividade de MT, diminuindo a produção e o número de frutos. Para melhor compreensão do efeito desses genes sobre a produção e número de frutos, serão necessários outros estudos, como por exemplo, alteração de rotas metabólicas e/ou aumento de suscetibilidade a estresse abiótico. Os bioensaios com folhas destacadas indicam que a expressão de *TgTLP1* aumenta a suscetibilidade de MT a *S. sclerotiorum*. Com relação ao gene *TgERF9* nota-se uma redução dos efeitos do *M. perniciosa* sobre o MT, eventualmente pela eliminação de ROS na planta, sem impedir, entretanto, a infecção. *TgPR10.1* aumenta a tolerância a *S. Sclerotiorum*, mas não apresenta efeitos sobre o desenvolvimento da VB. *TgPR10.1* alterou a altura das plantas, indicando alteração de balanço hormonal. Adicionalmente, transcritos de *TgPR10.1* foram localizados em tecidos da região da gema apical de ponta de galhos de cupuaçu, particularmente no procâmbio. Estudos mais detalhados, como medidas da concentração de fitohormônios e de ROS nos tecidos das plantas, RNAseq das plantas transformadas e efeitos sobre organismos endofíticos são necessários para compreender melhor a função desses genes no processo de resistência e suscetibilidade a doenças e os efeitos sobre produção de frutos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço Dr Ailton Reis, Dra Ana Beatriz Zacaroni, Dr Luis Alberto M. Palhares de Melo, João Artur V. S. Rabello e Lucas Bastos.

REFERÊNCIAS

- Agarwal P, Agarwal PK (2014) Pathogenesis related-10 proteins are small, structurally similar but with diverse role in stress signaling. *Mol Biol Rep* 41:599–611.
<https://doi.org/10.1007/s11033-013-2897-4>
- Aglas L, Soh WT, Kraiem A, et al (2020) Ligand Binding of PR-10 Proteins with a Particular Focus on the Bet v 1 Allergen Family. *Curr Allergy Asthma Rep* 20:.
<https://doi.org/10.1007/s11882-020-00918-4>
- Ambele CF, Ekesi S, Bisseleua HDB, et al (2020) Entomopathogenic Fungi as

- Endophytes for Biological Control of Subterranean Termite Pests Attacking Cocoa Seedlings. *J fungi* (Basel, Switzerland) 6:1–18. <https://doi.org/10.3390/jof6030126>
- Andrade LBDS, Oliveira AS, Ribeiro JKC, et al (2010) Effects of a novel pathogenesis-related class 10 (PR-10) protein from *crotalaria pallida* roots with papain inhibitory activity against root-knot nematode *meloidogyne incognita*. *J Agric Food Chem* 58:4145–4152. <https://doi.org/10.1021/jf9044556>
- Arnold AE, Lutzoni F (2007) Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88:541–549. <https://doi.org/10.1890/05-1459>
- Arraes FBM, Vasquez DDN, Tahir M, et al (2022) Integrated Omic Approaches Reveal Molecular Mechanisms of Tolerance during Soybean and *Meloidogyne incognita* Interactions. *Plants* 11:. <https://doi.org/10.3390/plants11202744>
- Bantignies B, Séguin J, Muzac I, et al (2000) Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots. *Plant Mol Biol* 42:871–881. <https://doi.org/10.1023/A:1006475303115>
- Besbes F, Habegger R, Schwab W (2019) Induction of PR-10 genes and metabolites in strawberry plants in response to *Verticillium dahliae* infection. *BMC Plant Biol* 19:1–17. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1718-x>
- Biesiadka J, Bujacz G, Sikorski MM, Jaskolski M (2002) Crystal structures of two homologous pathogenesis-related proteins from yellow lupine. *J Mol Biol* 319:1223–1234. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00385-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00385-6)
- Bohle B, Radakovics A, Jahn-Schmid B, et al (2003) Bet v 1, the major birch pollen allergen, initiates sensitization to Api g 1, the major allergen in celery: Evidence at the T cell level. *Eur J Immunol* 33:3303–3310. <https://doi.org/10.1002/eji.200324321>
- Breiteneder H, Pettenburger K, Bito A, et al (1989) The gene coding for the major birch pollen allergen BetvI, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J* 8:1935–1938. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03597.x>
- Bufe A, Spangfort MD, Kahlert H, et al (1996) The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. *Planta* 199:413–415. <https://doi.org/10.1007/BF00195733>
- Cai S, Qiao X, Feng L, et al (2018) Python Cathelicidin cathpb1 Protects against Multidrug-Resistant Staphylococcal Infections by Antimicrobial-Immunomodulatory Duality. *J Med Chem* 61:2075–2086.

- <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00036>
- Camehl I, Oelmüller R (2010) Do ethylene response factorS9 and -14 repress PR gene expression in the interaction between *Piriformospora indica* and Arabidopsis? *Plant Signal Behav* 5:932–936. <https://doi.org/10.4161/psb.5.8.12036>
- Casañal A, Zander U, Muñoz C, et al (2013) The strawberry pathogenesis-related 10 (PR-10) Fra proteins control flavonoid biosynthesis by binding to metabolic intermediates. *J Biol Chem* 288:35322–35332. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.501528>
- Chadha P, Das RH (2006) A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: An insight of its mode of antifungal activity. *Planta* 225:213–222. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0344-7>
- Chen JY, Dai XF (2010) Cloning and characterization of the *Gossypium hirsutum* major latex protein gene and functional analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 231:861–873. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1092-2>
- Chen L, Sun N, Wang J, et al (2013) Functional Analysis of a Wilt Fungus Inducible <i>PR</i>-1 Gene from Cotton. *Am J Plant Sci* 04:417–426. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.42a054>
- Chen PY, Wang CK, Soong SC, To KY (2003) Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Mol Breed* 11:287–293. <https://doi.org/10.1023/A:1023475710642>
- Chiu T, Poucet T, Li Y (2022) The potential of plant proteins as antifungal agents for agricultural applications. *Synth Syst Biotechnol* 7:1075–1083. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2022.06.009>
- Costa JL, Paschoal D, da Silva EM, et al (2021) *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. *New Phytol* 231:365–381. <https://doi.org/10.1111/nph.17386>
- Dan Y, Yan H, Munyikwa T, et al (2006) MicroTom - A high-throughput model transformation system for functional genomics. *Plant Cell Rep* 25:432–441. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0084-3>
- Deganello J, Leal GA, Rossi ML, et al (2014a) Interaction of *Moniliophthora perniciosa* biotypes with micro-tom tomato: A model system to investigate the witches' broom disease of theobroma cacao. *Plant Pathol* 63:1251–1263. <https://doi.org/10.1111/ppa.12206>

- Deganello J, Leal GA, Rossi ML, et al (2014b) Interaction of *moniliophthora perniciosa* biotypes with micro-tom tomato: A model system to investigate the witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Plant Pathol* 63:1251–1263.
<https://doi.org/10.1111/ppa.12206>
- Doyle J, Doyle L (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11–15
- Dusi DMA (2015) Hibridização *in situ* para detecção da expressão de genes em tecidos vegetais. In: Brasileiro, ACM.; Carneiro VTC (ed) Manual de transformação genética de plantas, 2nd edn. Brasilia-DF, pp 303–327
- Falcão LL, Neves M da S, Gomes ACMM, et al (2019) Processing apical meristems of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) for gene expression studies using *in situ* hybridization. *Bol. Pesqui. E Desenvolv.* 357 17
- Falcão LL, Silva-Werneck JO, Albuquerque PSB, et al (2022) Comparative transcriptomics of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) offers insights into the early defense mechanism to *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease. *J Plant Interact* 17:991–1005.
<https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2144650>
- Fang X, Ma J, Guo F, et al (2022) The AP2/ERF GmERF113 Positively Regulates the Drought Response by Activating GmPR10-1 in Soybean. *Int J Mol Sci* 23:.
<https://doi.org/10.3390/ijms23158159>
- Fernandes H, Bujacz A, Bujacz G, et al (2009) Cytokinin-induced structural adaptability of a *Lupinus luteus* PR-10 protein. *FEBS J* 276:1596–1609.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06892.x>
- Fernandes H, Michalska K, Sikorski M, Jaskolski M (2013) Structural and functional aspects of PR-10 proteins. *FEBS J* 280:1169–1199.
<https://doi.org/10.1111/febs.12114>
- Fernandes H, Pasternak O, Bujacz G, et al (2008) *Lupinus luteus* Pathogenesis-Related Protein as a Reservoir for Cytokinin. *J Mol Biol* 378:1040–1051.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.03.027>
- Fierens E, Gebruers K, Voet ARD, et al (2009) Biochemical and structural characterization of TLXI, the *Triticum aestivum* L. thaumatin-like xylanase inhibitor. *J Enzyme Inhib Med Chem* 24:646–654.
<https://doi.org/10.1080/14756360802321831>
- Finch W, Bolin JE, Kelley K (2014) *Multilevel Modelling Using R*. CRC Press, Taylor

- & Francis, Boca Raton,
- Flores T, Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Flores HE (2002) Ocatin. A novel tuber storage protein from the Andean tuber crop oca with antibacterial and antifungal activities. *Plant Physiol* 128:1291–1302. <https://doi.org/10.1104/pp.010541>
- Fradin EF, Thomma BPHJ (2006) Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol Plant Pathol* 7:71–86. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00323.x>
- Franco SDF, Baroni RM, Carazzolle MF, et al (2015) Genomic analyses and expression evaluation of thaumatin-like gene family in the cacao fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Biochem Biophys Res Commun* 466:629–636. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.054>
- Führer S, Unterhauser J, Zeindl R, et al (2022) The Structural Flexibility of PR-10 Food Allergens. *Int J Mol Sci* 23:. <https://doi.org/10.3390/ijms23158252>
- Garg H, Li H, Sivasithamparam K, Barbetti MJ (2013) Differentially Expressed Proteins and Associated Histological and Disease Progression Changes in Cotyledon Tissue of a Resistant and Susceptible Genotype of *Brassica napus* Infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. *PLoS One* 8:e65205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065205>
- Gowda C, Purama SNS, Kammara R (2020) TLPdb: A Resource for Thaumatin-Like Proteins. *Protein J* 39:301–307. <https://doi.org/10.1007/s10930-020-09909-w>
- Guo ZJ, Chen XJ, Wu XL, et al (2004) Overexpression of the AP2/EREBP transcription factor OPBP1 enhances disease resistance and salt tolerance in tobacco. *Plant Mol Biol* 55:607–618. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-1521-3>
- Hashimoto M, Kisseleva L, Sawa S, et al (2004) A novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. *Plant Cell Physiol* 45:550–559. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch063>
- He M, Xu Y, Cao J, et al (2013) Subcellular localization and functional analyses of a PR10 protein gene from *Vitis pseudoreticulata* in response to *Plasmopara viticola* infection. *Protoplasma* 250:129–140. <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0384-8>
- Herberich E, Sikorski J, Hothorn T (2010) A robust procedure for comparing multiple means under heteroscedasticity in unbalanced designs. *PLoS One* 5:1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009788>
- Jain S (2015) The Pathogenesis Related Class 10 proteins in Plant Defense against

- Biotic and Abiotic Stresses. *Adv Plants Agric Res* 2:305–314.
<https://doi.org/10.15406/apar.2015.02.00077>
- Kagale S, Rozwadowski K (2011) EAR motif-mediated transcriptional repression in plants: An underlying mechanism for epigenetic regulation of gene expression. *Epigenetics* 6:141–146. <https://doi.org/10.4161/epi.6.2.13627>
- Karlsson AL, Aim R, Ekstrand B, et al (2004) Bet v 1 homologues in strawberry identified as IgE-binding proteins and presumptive allergens. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 59:1277–1284. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2004.00585.x>
- Lacorte C, Barros LMG (2015) Genes repórteres *gus* (β -glucuronidase) e *gfp* (proteína verde-fluorescente). In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO VTC (ed) *Manual de transformação genética de plantas*. 2.ed. Brasília: Embrapa, 2nd edn. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília-DF, pp 147–164
- Lacorte C, Romano E (2015) Transferência de vetores para *Agrobacterium spp.* In: Brasileiro, ACM.; Carneiro VTC (ed) *Manual de transformação genética de plantas*. 2. ed. Brasília:, 2nd edn. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 55–71
- Lamo FJ, Šimkovicová M, Fresno DH, et al (2021) Pattern-triggered immunity restricts host colonization by endophytic fusaria, but does not affect endophyte-mediated resistance. *Mol Plant Pathol* 22:204–215. <https://doi.org/10.1111/mpp.13018>
- Lebel S, Schellenbaum P, Walter B, Maillot P (2010) Characterisation of the *Vitis vinifera* PR10 multigene family. *BMC Plant Biol* 10:184.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-184>
- Li Z, Huang Q, Lin B, et al (2022) CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of a representative member of a novel PR10/Bet v1-like protein subfamily significantly reduces rice plant height and defense against *Meloidogyne graminicola*. *Phytopathol Res* 4:. <https://doi.org/10.1186/s42483-022-00143-z>
- Liu JJ, Sturrock R, Ekramoddoullah AKM (2010) The superfamily of thaumatin-like proteins: Its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Rep* 29:419–436. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0826-8>
- Liu X, Huang B, Lin J, et al (2006) A novel pathogenesis-related protein (SsPR10) from *Solanum surattense* with ribonucleolytic and antimicrobial activity is stress- and pathogen-inducible. *J Plant Physiol* 163:546–556.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.04.031>
- Marković-Housley Z, Degano M, Lamba D, et al (2003) Crystal structure of a

- hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *J Mol Biol* 325:123–133.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01197-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01197-X)
- Maruyama Y, Yamoto N, Suzuki Y, et al (2013) The *Arabidopsis* transcriptional repressor ERF9 participates in resistance against necrotrophic fungi. *Plant Sci* 213:79–87. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.08.008>
- Matsumoto-Kitano M, Kusumoto T, Tarkowski P, et al (2008) Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:20027–20031.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0805619105>
- Mendgen K, Hahn M, Deising H (1996) Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* 34:367–386.
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.367>
- Menezes SP, dos Santos JL, Cardoso THS, et al (2012) Evaluation of the Allergenicity Potential of TcPR-10 Protein from *Theobroma cacao*. *PLoS One* 7:e37969.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037969>
- Mogensen JE, Ferreras M, Wimmer R, et al (2007) The major allergen from birch tree pollen, Bet v 1, binds and permeabilizes membranes. *Biochemistry* 46:3356–3365.
<https://doi.org/10.1021/bi062058h>
- Morris JS, Caldo KMP, Liang S, Facchini PJ (2021) PR10/Bet v1-like Proteins as Novel Contributors to Plant Biochemical Diversity. *ChemBioChem* 22:264–287.
<https://doi.org/10.1002/cbic.202000354>
- Munis MFH, Tu L, Deng F, et al (2010) A thaumatin-like protein gene involved in cotton fiber secondary cell wall development enhances resistance against *Verticillium dahliae* and other stresses in transgenic tobacco. *Biochem Biophys Res Commun* 393:38–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.01.069>
- Newton SS, Duman JG (2000) An osmotin-like cryoprotective protein from the bittersweet nightshade *Solanum dulcamara*. *Plant Mol Biol* 44:581–589.
<https://doi.org/10.1023/A:1026599028063>
- Park C-J, Kim K-J, Shin R, et al (2004) Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J* 37:186–198.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01951.x>
- Petre B, Major I, Rouhier N, Duplessis S (2011) Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. *BMC Plant Biol* 11:33.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-33>

- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pino L, Lombardi-Crestana S, Azevedo M, et al (2010) The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato “Micro-Tom” model system. *Plant Methods* 6:23
- Pungartnik C, Da Silva AC, De Melo SA, et al (2009) High-affinity copper transport and Snq2 export permease of *Saccharomyces cerevisiae* modulate cytotoxicity of PR-10 from *Theobroma cacao*. *Mol Plant-Microbe Interact* 22:39–51. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-1-0039>
- Radauer C, Lackner P, Breiteneder H (2008) The Bet v 1 fold: An ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC Evol Biol* 8:1–19. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-286>
- Rajendram A, Mostaffa NH, Dumin W, et al (2022) Dual activity of *Meloidogyne incognita*-regulated *Musa acuminata* Pathogenesis-related-10 (MaPR-10) gene. *Gene* 809:146041. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.146041>
- Reis A, Giordano LB, Lopes CA, Boiteux LS (2004) Novel sources of multiple resistance to three races of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* in *Lycopersicon germplasm*. *Crop Breed Appl Biotechnol* 4:495–502. <https://doi.org/10.12702/1984-7033.v04n04a19>
- Riefler M, Brüggemann T, Fladung M, Schmülling T (2022) A Constitutively Active Cytokinin Receptor Variant Increases Cambial Activity and Stem Growth in Poplar. *Int J Mol Sci* 23:. <https://doi.org/10.3390/ijms23158321>
- Romano E, Leal-Bertioli SC de M (2015) Extração e quantificação de DNA de tecidos vegetais. In: Brasileiro ACM. C (ed) Manual de transformação genética de plantas, 2nd edn. Brasilia-DF, pp 165–180
- Seutter von Loetzen C, Hoffmann T, Hartl MJ, et al (2014) Secret of the major birch pollen allergen Bet v 1: identification of the physiological ligand. *Biochem J* 457:379–390. <https://doi.org/10.1042/BJ20130413>
- Shoukri MM (2018) Analysis of correlated data with SAS and R, 4th edn. Boca Raton: CRC Press
- Silva-Werneck JO, Barros LMG, Neves M da S, et al (2018) Transformação de tomate Micro-Tom com um gene tipo-. *Bol. Pesqui. E Desenvol. Embrapa* 343:1–20
- Silva FAC, Pirovani CP, Menezes S, et al (2013) Proteomic response of *Moniliophthora perniciosa* exposed to pathogenesis-related protein-10 from *Theobroma cacao*.

- Genet Mol Res 12:4855–4868. <https://doi.org/10.4238/2013.October.22.5>
- Simpson DJ, Fincher GB, Huang AH, Cameron-Mills V (2003) Structure and Function of Cereal and Related Higher Plant (1→4)-β-Xylan Endohydrolases. *J Cereal Sci* 37:111–127. <https://doi.org/10.1006/jcrs.2002.0488>
- Singh NK, Bracker CA, Hasegawa PM, et al (1987) Characterization of Osmotin. *Plant Physiol* 85:529–536. <https://doi.org/10.1104/pp.85.2.529>
- Sinha RK, Verma SS, Rastogi A (2020) Role of pathogen-related protein 10 (PR 10) under abiotic and biotic stresses in plants. *Phyton (B Aires)* 89:167–182. <https://doi.org/10.32604/phyton.2020.09359>
- Sliwiak J, Sikorski M, Jaskolski M (2018) <scp>PR</scp> -10 proteins as potential mediators of melatonin-cytokinin cross-talk in plants: crystallographic studies of L1 <scp>PR</scp> -10.2B isoform from yellow lupine. *FEBS J* 285:1907–1922. <https://doi.org/10.1111/febs.14455>
- Smole U, Bublin M, Radauer C, et al (2008) Mal d 2, The Thaumatin-Like Allergen from Apple, Is Highly Resistant to Gastrointestinal Digestion and Thermal Processing. *Int Arch Allergy Immunol* 147:289–298. <https://doi.org/10.1159/000144036>
- Somssich IE, Schmelzer E, Bollmann J, Hahlbrock K (1986) Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding “pathogenesis-related” proteins in cultured parsley cells. *Proc Natl Acad Sci* 83:2427–2430. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.8.2427>
- Srivastava S, Emery RJN, Kurepin LV, et al (2006) Pea PR 10.1 is a ribonuclease and its transgenic expression elevates cytokinin levels. *Plant Growth Regul* 49:17–25. <https://doi.org/10.1007/s10725-006-0022-6>
- Su H, Jiao YT, Wang FF, et al (2018) Overexpression of VpPR10.1 by an efficient transformation method enhances downy mildew resistance in *V. vinifera*. *Plant Cell Rep* 37:819–832. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2271-z>
- Sun HJ, Uchii S, Watanabe S, Ezura H (2006) A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol* 47:426–431. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci251>
- Takahashi H, Shimizu A, Arie T, et al (2005) Catalog of Micro-Tom tomato responses to common fungal, bacterial, and viral pathogens. *J Gen Plant Pathol* 71:8–22. <https://doi.org/10.1007/s10327-004-0168-x>
- Teixeira PJPL, Thomazella DPT, Vidal RO, et al (2012) The Fungal Pathogen *Moniliophthora perniciosa* Has Genes Similar to Plant PR-1 That Are Highly

- Expressed during Its Interaction with Cacao. PLoS One 7:e45929–e45929.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045929>
- Tsutsui T, Kato W, Asada Y, et al (2009) DEAR1, a transcriptional repressor of DREB protein that mediates plant defense and freezing stress responses in *Arabidopsis*. J Plant Res 122:633–643. <https://doi.org/10.1007/s10265-009-0252-6>
- Vadassery J, Ritter C, Venus Y, et al (2008) The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. Mol Plant-Microbe Interact 21:1371–1383. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-10-1371>
- Van Loon LC (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. Eur J Plant Pathol 103:753–765
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. Annu Rev Phytopathol 44:135–162.
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
- Vasconcelos AA, José J, Tokimatu PM, et al (2021) Adaptive evolution of *Moniliophthora* PR-1 proteins towards its pathogenic lifestyle. BMC Ecol Evol 21:1–16. <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01818-5>
- Wang L, Wei J, Zou Y, et al (2014) Molecular characteristics and biochemical functions of vppr10s from *Vitis pseudoreticulata* associated with biotic and abiotic stresses. Int J Mol Sci 15:19162–19182. <https://doi.org/10.3390/ijms151019162>
- Wel H, Loeve K (1972) Isolation and Characterization of Thaumatin I and II, the Sweet-Tasting Proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. Eur J Biochem 31:221–225. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1972.tb02522.x>
- Wu L, Ma N, Jia Y, et al (2017) An ethylene-induced regulatory module delays flower senescence by regulating cytokinin content. Plant Physiol 173:853–862.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.01064>
- Xie YR, Chen ZY, Brown RL, Bhatnagar D (2010) Expression and functional characterization of two pathogenesis-related protein 10 genes from *Zea mays*. J Plant Physiol 167:121–130. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.07.004>
- Xu T-F, Zhao X-C, Jiao Y-T, et al (2014) A Pathogenesis Related Protein, VpPR-10.1, from *Vitis pseudoreticulata*: An Insight of Its Mode of Antifungal Activity. PLoS One 9:e95102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095102>
- Yang CL, Liang S, Wang HY, et al (2015) Cotton major latex protein 28 functions as a positive regulator of the ethylene responsive factor 6 in defense against *Verticillium dahliae*. Mol Plant 8:399–411.

<https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.023>

- Zandvakili N, Zamani M, Motallebi M, Jahromi ZM (2017) Cloning, overexpression and in vitro antifungal activity of *Zea mays* PR10 protein. *Iran J Biotechnol* 15:42–49. <https://doi.org/10.15171/ijb.1357>
- Zhang Y, Ming R, Khan M, et al (2022) ERF9 of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. undergoes feedback regulation by ethylene and modulates cold tolerance via regulating a glutathione S-transferase U17 gene. *Plant Biotechnol J* 20:183–200. <https://doi.org/10.1111/pbi.13705>
- Zhou W, Bias K, Lenczewski-Jowers D, et al (2022) Analysis of Protein Sequence Identity, Binding Sites, and 3D Structures Identifies Eight Pollen Species and Ten Fruit Species with High Risk of Cross-Reactive Allergies. *Genes (Basel)* 13:. <https://doi.org/10.3390/genes13081464>
- Zhu B, Chen THH, Li PH (1993) Expression of an ABA-responsive osmotin-like gene during the induction of freezing tolerance in *Solanum commersonii*. *Plant Mol Biol* 21:729–735. <https://doi.org/10.1007/BF00014558>
- Zubini P, Zambelli B, Musiani F, et al (2009) The RNA hydrolysis and the cytokinin binding activities of PR-10 proteins are differently performed by two isoforms of the Pru p 1 peach major allergen and are possibly functionally related. *Plant Physiol* 150:1235–1247. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139543>

CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho foi gerado um banco com sequências de transcritos de cupuaçu em pontas de galhos (gemmas apicais) de um genótipo suscetível (1074) e outro resistente (174) VB, que está sendo utilizado por diferentes grupos para realização de vários estudos e na montagem e anotação do genoma de cupuaçu. Além disso, este foi o primeiro transcriptoma em larga escala de *T. grandiflorum*. Análise da expressão diferencial permitiu identificar diferenças marcantes nos perfis de resposta a infecção por *M. perniciosa* nos genótipos contrastantes (GS e GR), nos estágios iniciais da interação entre a planta e o fitopatógeno. No genótipo suscetível, houve indução rápida e intensa da expressão gênica, enquanto no genótipo resistente, a resposta é retardada e um conjunto gênico diferente é induzido ou reprimido. As principais diferenças entre GR e GS foram: expressão diferente de proteínas PRR, como RLK (receptor like quinases) no RG; padrões opostos de expressão de alguns FTs e PRs; GR favorece a resposta ao estresse biótico, enquanto o GS favorece a resposta ao ferimento; metabolismo ROS, onde GR enriqueceu o termo GO “atividade peroxidase”, enquanto GS enriqueceu “enzimas oxidoredutase”; diferentes expressões de proteínas que atuam na parede celular; ativação de diferentes vias de terpenos; diferentes assinaturas de fitohormônios. A análise contrastando diretamente (GS x GR) permitiu identificar diferenças importantes independentes da inoculação, como por exemplo, uma lista de transcritos que codificam para receptores de membrana (PRRs) que podem estar envolvidos no reconhecimento da presença do fungo; perfil de respostas de defesa ativadas no genótipo suscetível, o que pode afetar a comunidade endofítica e induzir a expressão de proteínas de virulência ou ativar precocemente os mecanismos de defesa do fungo. Os estudos de função de genes potencialmente envolvidos nos mecanismos de compatibilidade e incompatibilidade, *TgERF9*, *TgTLP1*, *TgPRI0.1*, permitiram avanços que, entretanto, precisam ser complementados para maior compreensão. A avaliação dos genes *TgERF9*, *TgTLP1* *TgPRI0.1* pela expressão em tomate MT e desafio com patógenos, revelou o efeito de cada um deles *in planta*. Os genes *TgERF9* e *TgTLP1* parecem interferir na produtividade de MT, diminuindo a produção e o número de frutos. Para melhor compreensão do efeito desses genes sobre a produção e número de frutos, serão necessários outros estudos, como possível alteração de rotas metabólicas, e/ ou aumento de suscetibilidade a estresse abiótico. Os bioensaios com folhas destacadas indicam que a expressão de *TgTLP1* aumenta suscetibilidade de MT a *S. sclerotiorum*. Com relação ao gene *TgERF9* nota-se uma redução dos efeitos do *M. perniciosa* sobre o MT,

eventualmente pela eliminação de ROS na planta, sem impedir, entretanto, a infecção. *TgPR10.1* aumenta a tolerância a *S. Sclerotiorum*, mas não apresenta efeitos sobre o desenvolvimento da VB. *TgPR10.1* alterou a altura das plantas, indicando alteração de balanço hormonal. Adicionalmente, transcritos de *TgPR10.1* foram localizados em tecidos da região da gema apical de ponta galhos de cupuaçu, particularmente no procâmbio. Estudos mais detalhados, como medidas da concentração de fitohormônios e de ROS nos tecidos das plantas, RNAseq das plantas transformadas e efeitos sobre organismos endofíticos são necessários para compreender melhor a função desses genes no processo de resistência e suscetibilidade a doenças e os efeitos sobre produção de frutos. Os dados gerados nesse trabalho podem ser um recurso valioso para análises mais profundas, como biologia de sistemas, estudos genômicos, análise de promotores de genes e estudos funcionais, fornecendo maiores esclarecimentos sobre os mecanismos envolvidos na resistência e suscetibilidade em cupuaçuzeiros, subsidiando o desenvolvimento de programas e estratégias de melhoramento do cupuaçu.

ANEXOS

Banco de dados *Theobroma Grandiflorum*

Cupuacu RNAseq transcriptome analysis
<http://lbi.cenargen.embrapa.br/cupuacu/>

Prêmio



Artigos e Boletins de Pesquisa publicados relacionados ao trabalho de tese

Falcão LL, Silva-Werneck JO, Albuquerque PSB, et al (2022) Comparative transcriptomics of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) offers insights into the early defense mechanism to *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease. *J Plant Interact* 17:991–1005. <https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2144650>

Santos LF dos, Silva RJS, **Falcão LL**, et al (2022) Cupuassu (*Theobroma grandiflorum* [Willd. ex Sprengel] Schumann) Fruit Development: Key Genes Involved in Primary Metabolism and Stress Response. *Agronomy* 12:763. <https://doi.org/10.3390/agronomy12040763>

Falcão LL, Neves M da S, Gomes ACMM, et al (2019) Processing apical meristems of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) for gene expression studies using in situ

hybridization. Bol. Pesqui. e Desenvol. 357 17

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/211640/1/Boletim-Cupuacu-35712.pdf>

Silva-Werneck JO, Barros LMG, **Falcão LL**, et al (2018) Transformação de tomate Micro-Tom com um gene tipo-PR de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) visando ao estudo de função da proteína. Bol. Pesqui. E Desenvol. Embrapa 343:1–20

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/191048/1/Boletim-tomate-343.pdf>

Preparo de meristemas apicais de cupuaçuzeiro
(*Theobroma grandiflorum*) para estudos de
expressão de genes por hibridização in situ



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
357**

**Preparo de meristemas apicais de
cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*)
para estudos de expressão de
genes por hibridização in situ**

*Loeni Lüdke Falcão
Michelly da Silva Neves
Ana Cristina Meneses Mendes Gomes
Joseilde Oliveira Silva-Werneck
Diva Maria de Alencar Dusi
Lucilia Helena Marcellino*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717 , Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4700
Fax: +55 (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Milene Castellen Sathler

Secretária-Executiva
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Membros
Antonieta Nassif Salomão; Bianca Damiani Marques; Diva Maria Alencar Dusi; Francisco Guilherme V. Schmidt; João Batista Tavares da Silva; João Batista Teixeira; Rosameres Rocha Galvão; Tânia da Silveira Agostini Costa

Supervisão editorial
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Revisão de texto
Diva Maria Alencar Dusi

Normalização bibliográfica
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Tratamento das ilustrações
Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Adilson Werneck

Foto da capa
Lucilia Helena Marcelino

1ª edição
1ª impressão (ano): tiragem

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Preparo de meristemas apicais de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) para estudos de expressão de genes por hibridização in situ. / Loeni Lüdke Falcão et al. ... – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019.

17 p. - (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 357).

ISSN: 0102-0110
Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader
Modo de Acesso: World Wide Web

1. Expressão gênica. 2. Morfologia. I. Falcão, Loeni Lüdke. II. Neves, Michelly da Silva. III. Gomes, Ana Cristina M. Mendes. IV. Silva-Werneck, Joseilde Oliveira. V. Dusi, Diva Maria de Alencar. VI. Marcellino, Lucilia Helena. VII. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. X. Série

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	11
Agradecimentos.....	15
Referência Bibliográfica.....	16

Preparo de meristemas apicais de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) para estudos de expressão de genes por hibridização in situ

Loeni Lüdke Falcão¹

Michelly da Silva Neves²

Ana Cristina Meneses Mendes Gomes³

Joseilde Oliveira Silva-Werneck⁴

Diva Maria de Alencar Dusi⁵

Lucilia Helena Marcellino⁶

Resumo – O cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., é uma espécie nativa da Amazônia que produz uma das frutas mais populares da região, o cupuaçu. Sua polpa tem sabor e aroma muito apreciados, sendo utilizada na fabricação de uma grande diversidade de doces e na preparação de sucos. A partir das amêndoas é possível produzir o cupulate, produto similar ao chocolate. A cultura do cupuaçuzeiro tem relevante importância econômica para a região amazônica. Um dos entraves para esta cultura, no entanto, é a doença vassoura-de-bruxa (VB), causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, que compromete o desenvolvimento e a produção da planta. Este fungo acomete inicialmente as regiões meristemáticas do cupuaçuzeiro, particularmente o meristema da gema apical, causando superbrotamento, hipertrofia e hiperplasia dos tecidos, que acabam morrendo. Para maior entendimento do processo de infecção, genes relacionados à patogênese, particularmente os genes que codificam para as proteínas PR (*pathogenesis-related*), foram identificados em cupuaçuzeiro. Estudos de expressão temporal e espacial destes genes nos tecidos-alvo da infecção são necessários para acrescentar informações sobre a função de

¹ Engenheira agrônoma, mestre em Ciências Agrárias, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Bióloga, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Bióloga, mestre em Ciências Agrárias, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁴ Engenheira agrônoma, doutora em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁵ Engenheira Agrônoma, doutora em "Plant Science", pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁶ Bióloga, doutora em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

cada um no desenvolvimento da doença. Para tanto, torna-se necessário o estabelecimento de um método eficiente de hibridização *in situ* que permita identificar os locais e momentos específicos da expressão dos genes de interesse. Neste trabalho foi ajustada metodologia de hibridização *in situ* em gemas apicais de cupuaçuzeiros, desde a fixação e preparo do material vegetal até as condições de hibridização e pós-hibridização. Gemas apicais de galhos de cupuaçuzeiro foram coletadas e processadas para avaliação morfo-anatômica por microscopia de luz. Fragmento de cDNA de um gene de proteína do tipo PR foi clonado em pGEM®-T Easy e sondas de mRNA senso e antisenso marcadas com digoxigenina, produzidas por transcrição, foram utilizadas para a hibridização *in situ* em meristemas de cupuaçu. A técnica utilizada mostrou ser viável para a localização da expressão de genes neste tecido.

Termos para indexação: cupuaçu, expressão gênica, meristema apical, morfologia, hibridização *in situ*

Processing apical meristems of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) for gene expression studies using *in situ* hybridization

Abstract – The cupuassu tree, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., is a native Amazonian species that produces one of the most popular fruits in the region, cupuassu. The pulp of cupuassu is much appreciated for its flavor and aroma, being used in the manufacture of a wide variety of sweets and in the preparation of juices. From their almonds it is possible to produce cupulate, a product similar to chocolate. The cupuassu tree culture has relevant economic importance for the Amazon region. One of the barriers to the culture is the witches' broom disease (WB), caused by the fungus *Moniliophthora perniciosa*, which hampers plant development and production. This fungus attacks the meristematic region of the cupuassu tree, particularly the apical bud meristem, causing proliferation of buds, hypertrophy and hyperplasia of the tissues, which eventually die. For a better understanding of the process of infection, genes related to pathogenesis, specifically genes coding for PR proteins, were identified in cupuassu. Studies of temporal and spatial expression of these genes in the infection target tissues are required to add information about their role in disease development. In this work, *in situ* hybridization methodology in cupuassu tree apical buds has been adjusted, from the fixation and preparation of the plant material to the hybridization and post hybridization conditions. Apical shoots of cupuassu tree branches were collected, and processed for morphological and anatomical evaluation by light microscopy. A cDNA fragment from a PR-like protein gene was cloned

into pGEM®-T Easy, and sense and antisense mRNA probes labeled with digoxigenin, transcriptionally produced, were used for *in situ* hybridization in cupuassu meristems. This technique proved to be viable for gene expression localization in this tissue.

Index terms: cupuassu, gene expression, apical meristem, morphology, *in situ* hybridization

Introdução

O cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., é uma fruteira nativa da Amazônia com enorme potencial econômico devido às múltiplas utilidades de sua polpa e amêndoa. Vários produtos são fabricados com a polpa do cupuaçuzeiro, como sucos, sorvetes, licores, compotas, geleias, cremes e doces (Calzavara et al., 1984; Alves et al., 2014). As amêndoas são utilizadas para extração de gordura e fabricação de manteiga de cupuaçu e delas pode ser obtido o cupulate, produto muito similar ao chocolate (Ribeiro et al., 1992). A fina gordura das amêndoas, composta principalmente por ácidos oleico e esteárico, corresponde a 60% do seu peso seco e é de fácil digestibilidade (Vasconcelos et al., 1975; Alves et al., 2014).

O cupuaçuzeiro é suscetível à doença conhecida como vassoura-de-bruxa (VB), causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* que também ataca o cacauzeiro (*T. cacao*). A doença acomete diretamente os ramos vegetativos, as almofadas florais e o próprio fruto. A planta infectada apresenta um crescimento anormal, caracterizado por um brotamento acelerado de gemas laterais que logo secam e morrem. A doença interfere no processo de fotossíntese e compromete significativamente a produtividade da planta (Benchimol et al., 2001). Em frutos jovens, a ocorrência de VB paralisa o crescimento e, nos estádios mais tardios de desenvolvimento, as cascas apresentam lesões escuras, inviabilizando o seu uso (Souza et al., 2012).

A vassoura-de-bruxa é uma doença de difícil controle, que exige no manejo da cultura, poda fitossanitária, aplicação de agrotóxicos cúpricos, além do uso de materiais vegetais mais resistentes (Gondim et al., 2001). O grande desafio do programa de melhoramento de cupuaçuzeiro é a obtenção

de plantas resistentes, que aliem alta produtividade e qualidade do fruto. Entretanto, pouco se conhece sobre as bases genéticas do cupuaçuzeiro, condição essencial para o desenvolvimento do programa de melhoramento da espécie.

Recentemente, foram iniciados estudos transcritômicos em cupuaçuzeiro, tendo sido obtidos cerca de 20.000 transcritos de gemas apicais de genótipos resistentes e suscetíveis à vassoura-de-bruxa, além de mais de 8.000 transcritos expressos no fruto. Estes transcritos, depositados no banco de dados de cupuaçu da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa..., 2019) permitiram a seleção de marcadores moleculares do tipo EST-SSR, com grande potencial de utilização em melhoramento de cupuaçuzeiro (Santos et al., 2016). Além disto, neste conjunto de dados foram encontradas sequências de grande interesse para estudos funcionais, como dos genes que codificam proteínas PR (pathogenesis-related). Estudos iniciais de expressão de genes do tipo PR em cupuaçuzeiro revelaram os níveis de expressão destes genes em meristemas de plantas resistentes e suscetíveis à VB, desafiadas com o patógeno em diferentes tempos de infecção, indicando uma participação importante no mecanismo de resistência de cupuaçuzeiro à VB (Silva, 2015). O entendimento dos mecanismos moleculares e a função de diversos genes envolvidos no processo de desenvolvimento da doença é a base para a proposição de ferramentas biotecnológicas que auxiliem na obtenção de plantas resistentes. Uma avaliação importante é conhecer o local de expressão de tais genes nos tecidos alvos de ataque do fungo, como os tecidos meristemáticos de gemas apicais. Uma técnica muito utilizada para a localização da expressão de genes é a hibridização in situ com sonda de RNA marcada com digoxigenina. Vários protocolos são utilizados para a hibridização in situ em tecidos vegetais, incluindo meristemas apicais de mudas jovens de cacau (*T. cacao*), nas quais foi investigada a localização da expressão de genes (Alemanno et al., 2008). Entretanto, para cada sonda, tecido e espécie a serem analisados, a metodologia deve ser ajustada. Isso envolve desde a fixação do material vegetal, o tempo adequado de hibridização, até o tempo de coloração para correta detecção da sonda. Neste trabalho, apresentamos a metodologia desenvolvida para o processamento de ápices caulinares de plantas adultas de *T. grandiflorum* e a análise da localização da expressão de genes por hibridização in situ.

Material e Métodos

Material Vegetal

Ápices caulinares (Fig. 1A) de plantas de *T. grandiflorum* (genótipo 1074) suscetíveis a vassoura-de-bruxa, mantidas em campo na Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC, Belém, PA).



Figura 1. Ápice caulinar de cupuaçuzeiro. A) Ápice retirado da planta; B) Ápice desbastado; a parte superior ao corte, contendo a gema apical, é a região utilizada para os estudos histo-morfológicos e para os ensaios de hibridização in situ.

Fixação e preparo das amostras

Ápices caulinares foram coletados, desbastados (Fig. 1B) e imediatamente colocados em solução fixadora de FAA [formaldeído 1,8% (v/v), etanol 60% (v/v) e ácido acético 5% (v/v)] por 24 horas. Os ápices foram transferidos para etanol 70% (v/v) e armazenados a -20 °C. Para identificação da região meristemática, as amostras foram dissecadas, cortadas ao meio longitudinalmente ou seccionadas a 100 µm com o uso de micrótomo de navalha vibratória (Vibratome® 3000) e observadas com auxílio de microscópio estereoscópico Discovery V8 (Zeiss), sendo fotodocumentadas ao microscópio Axiophot (Zeiss). O processamento das amostras para hibridização in situ foi baseado no protocolo descrito por Dusi (2015). A região meristemática das gemas foi isolada, parte dos tricomas foi retirada e os meristemas foram desidratados em série etílica crescente [etanol 80%, 90% e 96% (v/v)] por 30 minutos cada, e três vezes em etanol 100% por 1 hora

cada. Parte do material foi transferida para uma série de etanol:xilol (3:1, 1:1, 1:3) por 30 minutos cada, e três vezes em xilol puro, por 1 hora a cada troca. Parte das amostras foi tratada com HistoChoice® (Sigma Life Science) ao invés de xilol, da seguinte forma: ao frasco das amostras contendo 5 mL de etanol foram acrescentadas, lentamente, gotas de HistoChoice® até chegar, em dois dias, ao volume final de 10 mL; no dia seguinte, 5 mL da solução foram retirados e gotas de HistoChoice® foram acrescentadas, até atingir 10 mL ao final do dia. As amostras foram transferidas para HistoChoice® puro, por três vezes, a cada 12 horas. As amostras em xilol ou HistoChoice® foram então colocadas em estufa a 58 °C, e gotas de Paraplast®, uma mistura à base de parafina, previamente dissolvido, foram adicionadas lenta e periodicamente. Após aproximadamente 5 dias, a solução foi trocada para Paraplast® puro, por três vezes, durante 2 dias. As amostras foram então colocadas em formas e o Paraplast® polimerizado à temperatura ambiente.

Secções de 12 µm foram obtidas e depositadas em condições livres de RNase em lâminas de microscopia tratadas com organossilano. As lâminas foram mantidas a 42 °C por 24 horas e, então, armazenadas a 4 °C. Para remoção do Paraplast®, as lâminas foram imersas em xilol ou HistoChoice® por 15 minutos. Para verificar a preservação da morfologia e presença de RNA nos tecidos, algumas lâminas foram coradas com laranja de acridina (Dusi, 2015) e visualizadas em microscópio ótico Axiophot (Zeiss), utilizando filtro 450-490 nm de excitação - 520 nm de emissão. Com esta coloração, o RNA total no tecido fluoresce na cor laranja e o DNA, na cor verde. Outras lâminas foram utilizadas para hibridização in situ com sonda de *TgPR*.

Hibridização in situ

Um fragmento de aproximadamente 140 pb da sequência de nucleotídeo de um gene de proteína PR de cupuaçuzeiro (*TgPR*) foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega) e usado como molde para a transcrição in vitro das sondas (Fig. 2).



Figura 2. Esquema representativo de um fragmento do gene PR de cupuaçuzeiro (*TgPR*) clonado no vetor pGEMT-easy. Um fragmento de aproximadamente 140 pb do

gene *TgPR* foi clonado no sítio da enzima de restrição *Eco* RI, entre os promotores das T7 e SP6 RNA polimerases para a transcrição da sonda.

O plasmídeo foi linearizado com uma das duas enzimas *Nco* I ou *Sal* I. As sondas senso e antisenso de RNA marcadas com digoxigenina (DIG) foram sintetizadas utilizando o kit DIG RNA labeling (Roche) de acordo com o protocolo do fabricante. Para síntese da sonda senso foi utilizada a enzima T7 RNA polimerase, e para a sonda antisenso a enzima SP6 RNA polimerase. A hibridização in situ foi feita em secções de meristema de acordo com Dusi (2015). Secções de meristema processadas com HistoChoice® foram hibridizadas com a sonda senso ou antisenso a 0,6 ng.µL⁻¹ em tampão de hibridização (formamida 50%, solução de Denhardt 1X, tRNA 0,6 ng.µL⁻¹, NaCl 300 mM, sulfato de dextrano 10%, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 e EDTA 1 mM, pH 8.0). A hibridização foi feita a 42 °C, em câmara úmida, no escuro, em forno de hibridização In Slide Out, modelo 241000 (Boekel Scientific). Após 18 horas, as secções foram lavadas sequencialmente em solução SSC em 4 diferentes concentrações, iniciando pela de maior concentração (SSC 4X, SSC 2X, SSC 1X e SSC 0,5X, sendo SSC 1X = NaCl 150 mM, citrato de sódio 15 mM, pH 7,0), por 30 minutos em cada solução, a 37 °C. Em seguida, as secções foram imersas em tampão 1 (Tris-HCl, 100 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) e, então, em reagente de bloqueamento (Blocking reagente, Roche) a 1% (p/v) em tampão 1, por 30 minutos. As lâminas foram incubadas com anticorpos anti-digoxigenina (fragmentos Fab) conjugados a fosfatase alcalina (Roche) diluídos 1:1000 em tampão 1, por duas horas, e lavadas em tampão 1 por duas horas para remoção dos anticorpos. As lâminas foram transferidas para cubas de vidro contendo tampão 3 (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM), por 5 minutos. Em cada lâmina adicionaram-se 200 µL de solução de coloração (solução estoque NBT/BCIP - Roche) na diluição 1:50 em tampão 3. O desenvolvimento da coloração foi observado em microscópio estereoscópico aos 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 16 horas de incubação. Após 16 horas, as lâminas foram transferidas para cubas contendo tampão 4 (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM) para parar a reação. As lâminas, foram, então, montadas em glicerol a 50% (v/v) e visualizadas utilizando o microscópio ótico Axiophot (Zeiss). A coloração azul arroxeada indica o local de hibridização da sonda.

Resultados e Discussão

Plantas adultas de *T. grandiflorum* possuem ápices caulinares com gemas apicais apresentando meristemas envoltos em grande quantidade de tricomas. A coleta do material vegetal e sua imediata fixação em condições de campo é de difícil condução. Na coleta dos ápices caulinares, parte do caule é coletado junto com a amostra. Usualmente, na hibridização *in situ* são usados fixadores à base de aldeídos em solução aquosa como por exemplo, formaldeído 4% (v/v) e glutaraldeído 2% (v/v) por promoverem boa fixação do RNA e preservarem a morfologia. Entretanto, como o tecido utilizado é de planta adulta, e de difícil fixação, neste trabalho, foi escolhido o agente fixador FAA na concentração de 60% de etanol (v/v) de etanol, que apresenta a vantagem de penetrar rapidamente na amostra, e ainda permite que a morfologia seja preservada, assim como os ácidos nucleicos.

Inicialmente, para análise morfológica do ápice caulinar de plantas adultas de *T. grandiflorum*, foi realizado um corte longitudinal na região central do ápice caulinar, revelando tecido meristemático circundado por primórdios foliares e uma quantidade abundante de tricomas (Fig. 3 A). Utilizando o Vibratome® 3000, foram produzidas secções nas quais se observou claramente os primórdios foliares, tricomas e o meristema (Fig. 3 B, C e D).

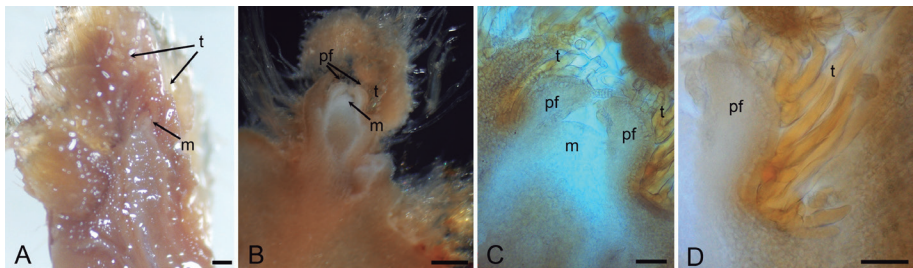


Figura 3. Gema apical de *Theobroma grandiflorum* (cupuaçuzeiro). Gema observada em microscópio estereoscópico (A e B) e em microscópio de luz com contraste de interferência diferencial (C e D). A) Corte longitudinal livre mostrando o meristema apical (m) e a profusão de tricomas (t) envolvendo toda a gema apical; B e C) Secção de 100 µm feita em vibratome apresenta o meristema protegido pelos primórdios foliares (pf) com tricomas. D) Detalhe dos tricomas no primórdio foliar. Barras: A= 1.000 µm; B= 200 µm; C e D = 50 µm.

A morfologia de folha de *Theobroma* foi previamente descrita para três espécies nativas da Amazônia brasileira, incluindo *T. grandiflorum*. No referido estudo, uma variedade de tipos de tricomas foi encontrada, glandulares e não glandulares, particularmente na superfície abaxial (Garcia et al., 2014). A alta densidade de tricomas também foi observada em um estudo por microscopia eletrônica, principalmente na superfície abaxial (Ferreira et al., 2006).

No preparo do material vegetal para a hibridização in situ, foram testadas duas metodologias de infiltração em Paraplast: com xilol ou HistoChoice®. As secções obtidas de material processado em xilol e coradas com laranja de acridina apresentaram tecidos com estruturas celulares e RNA total mal preservados, como observado pela baixa emissão de fluorescência (Fig. 4A, B). O material processado em HistoChoice® foi melhor preservado. Nota-se, por exemplo, que os primórdios foliares apresentaram células da epiderme, tricomas e demais tecidos foliares com alta fluorescência alaranjada, o que indica que o RNA total está preservado nas células (Fig. 4C). Também foi possível notar nestas secções que o citoplasma das células do tecido foliar apresentava fluorescência alaranjada, enquanto os núcleos fluoesciam em verde, indicando presença de DNA nuclear, como esperado (Fig. 4D). Foi observado que, além da retenção da estrutura, o material vegetal estava mais maleável e menos frágil do que o processado com xilol. Neste estudo, o processamento com HistoChoice® resultou em uma maior preservação da morfologia de meristemas apicais de plantas maduras de *T. grandiflorum*, tendo sido, portanto, escolhido no processamento de amostras para a hibridização in situ.

A hibridização in situ com sonda antisense de *TgPR*, produziu sinal em áreas específicas do meristema de *T. grandiflorum*. Sinal de hibridização (coloração arroxeadada) foi observado principalmente no meristema, nas células que formarão a epiderme nos primórdios foliares, e nos tricomas dos primórdios foliares (Fig. 4 E). Após hibridização com a sonda senso, não foi observada a coloração azul arroxeadada no tecido, indicando que esta sonda pode ser utilizada como controle negativo da hibridização (Fig. 4 F). A ausência de sinal nas secções hibridizadas com a sonda senso valida a especificidade dos sinais obtidos da hibridização com a sonda antisense.

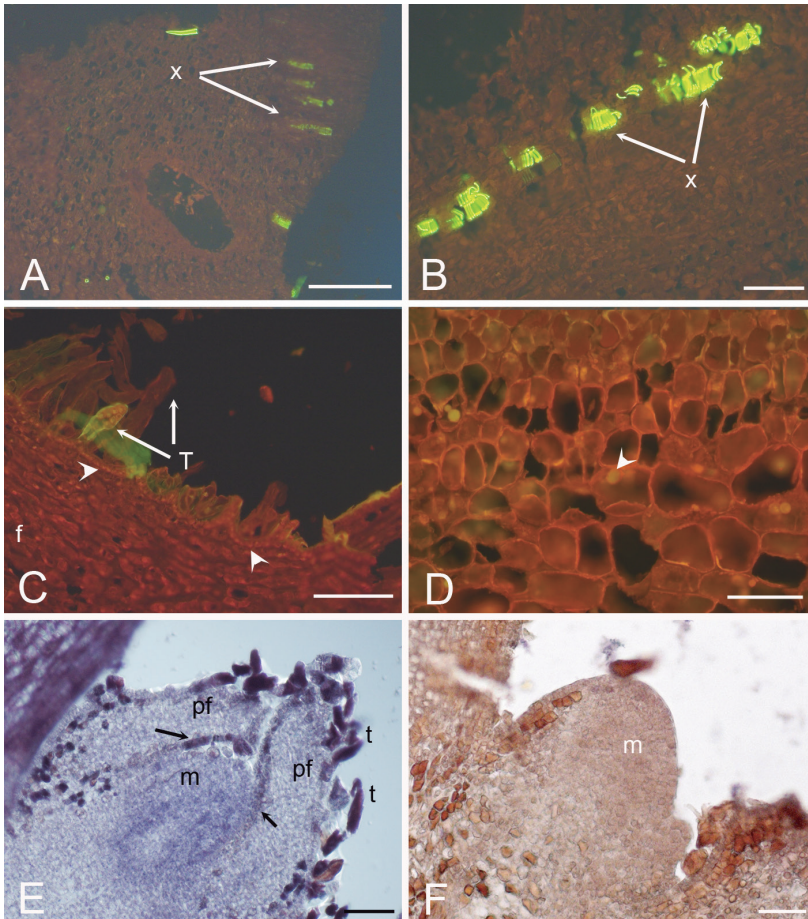


Figura 4. Detecção de RNA em gemas apicais de cupuacuzeiro. Coloração com laranja de acridina para detecção de RNA total (A-D) e hibridização in situ (E-F) em secções de gema apical de *Theobroma grandiflorum*. A-B) Amostra processada em xilol mostrando xilema (x) fluorescente. Note a má preservação do tecido com células distorcidas e tecidos desestruturados, e má preservação do RNA total, observado pela ausência de fluorescência alaranjada; C-F) Amostras processadas em HistoChoice®; C) Região abaxial da folha com células da epiderme (cabeça de seta), tricomas (t), e demais tecidos foliares (f), fluorescendo em alaranjado, indicando presença de RNA total nas células. D) Detalhe de tecido foliar com células e RNA total bem preservados. O núcleo das células (cabeça de seta) fluoresce na cor verde indicando presença de DNA; E) Após hibridização in situ com a sonda antisense do gene *TgPR*, o sinal de hibridização (coloração azul arroxeadada) pode ser observado no tecido meristemático

(m) e nos primórdios foliares (pf) em especial nas células que formarão a epiderme (setas) e nos tricomas (t); F) Após hibridização in situ com a sonda senso do gene *TgPR* como controle negativo, sem sinal de hibridização. Barras: A= 200 µm; B, E= 60 µm; C= 80 µm; D,F= 40 µm.

Assim, neste trabalho, utilizando gemas apicais de plantas adultas, foram estabelecidas as condições apropriadas para citolocalização da expressão de genes em cupuaçuzeiro. Em linhas gerais, a metodologia estabelecida pode ser assim resumida:

- Fixação do tecido com FAA 60%; armazenamento em etanol 70%
- Desidratação em série etílica (etanol 80% a 100% v/v);
- Clarificação com HistoChoice®;
- Inclusão com Paraplast®;
- Obtenção de secções de 12 µm e montagem das lâminas;
- Remoção do Paraplast® com HistoChoice®;
- Hibridização in situ a 42 °C e revelação com 16 h.

A metodologia aqui descrita viabiliza estudos mais detalhados de genes de interesse, como, por exemplo, aqueles envolvidos na resposta a estresses bióticos e abióticos. No estudo das bases moleculares do desenvolvimento da doença vassoura-de-bruxa, esta metodologia será importante na detecção da expressão gênica em genótipos de cupuaçuzeiro resistente e suscetível, e em diferentes tempos de inoculação com *M. perniciosa*.

Agradecimentos

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Agropolis (França) pelo cofinanciamento do projeto “Interação entre *Theobroma grandiflorum* e *Moniliophthora perniciosa*: Estudos de Associação e Genômica Funcional” (Embrapa nº 02.14.02.002.00.00). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa PIBIC à estudante Michelly da Silva Neves.

Referência Bibliográfica

ALEMANNI, L.; DEVIC, M.; NIEMENAK, N.; SANIER, C.; GUILLEMINOT, J.; RIO, M.; PASCAL, J. V. Characterization of leafy cotyledon1-like during embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Planta**, v. 227, n.4, p. 853–866, 2008.

ALVES, R. M.; FILGUEIRAS, G. C.; HOMMA, A. K. O. Aspectos socioeconômicos do cupuaçuzeiro na amazônia: do extrativismo a domesticação. In: SANTANA, A. C. de (Ed.). **Mercado, cadeia produtiva e desenvolvimento rural na Amazônia**. 1. ed. Belém, PA: UFRA, 2014. p. 197–223.

BENCHIMOL, R. L.; CARNEIRO, F.; ALBUQUERQUE, D.; MUNIZ, R. Aspectos epidemiológicos da vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro na microrregião de Belém, PA. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 2, p. 279–283, 2001.

CALZAVARA, B. B. G.; MÜLLER, C. H.; KAHWAGE, O. de N. da C. **Fruticultura tropical: o cupuaçuzeiro: cultivo, beneficiamento e utilização do fruto**. Belém, PA: EMBRAPA-CPATU, 1984. 101 p. il (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 32).

DUSI, D. M. A. Hibridização in situ para detecção da expressão de genes em tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. 2.ed. Brasília, DF: Embrapa, 2015. p. 303–327.

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. **Banco de dados: Cupuaçu RNAseq transcriptome analysis**. Disponível em: <http://lbi.cenargen.embrapa.br/cupuacu/>. Acesso em: 25 nov. 2019.

FERREIRA, M. das G. R.; NOGUEIRA, A. E.; FILHO, C. F. D. **Estudo morfológico de folhas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.)**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2006. 15 p. (Embrapa Rondônia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 33).

GARCIA, T. B.; POTIGUARA, R. C. de V.; KIKUCHI, T. Y. S.; DEMARCO, D.; AGUIAR-DIAS, A. C. A. de. Caracteres anatômicos foliares de três espécies de *Theobroma* (Malvaceae s.l.) nativas da Amazônia Brasileira. **Acta Amazonica**, v. 44, n. 3, p. 291-300, 2014.

GONDIM, T. M. de S.; THOMAZINI, M. J.; CAVALCANTE, M. de J. B.; SOUZA, J. M. L. de. **Aspectos da produção de cupuaçu**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2001. 43 p. (Embrapa Acre. Documentos, 67) .

RIBEIRO, N. C. de A.; SACRAMENTO, C. K. do; BARRETO, W. G.; SANTOS FILHO, L. P. dos. Características físicas e químicas de frutos de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) do Sudeste da Bahia. **Agrotopica**, Ilheus, v. 4, n. 2, p. 33-37, mai./ago. 1992.

SANTOS, L. F. dos; FREGAPANI, R. M.; FALCAO, L. L.; TOGAWA, R. C.; COSTA, M. M. do C.; LOPES, U. V.; GRAMACHO, K. P.; ALVES, R. M.;

MICHELI, F.; MARCELLINO, L. H. First microsatellite markers developed from cupuassu ESTs: application in diversity analysis and cross-species transferability to cacao. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, e0151074, 2016.

SILVA, R. J. S. **Caracterização in silico e análise de expressão de genes do tipo PR de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*)**. 2015. 92 p. (Dissertação - Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Santa Cruz, 2015.

SOUZA, M. G.; ALMEIDA, O. C.; SOUZA, A. G. C. Vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro na Amazônia. **Tropical Plant Pathology** (supl.), v. 37, p. 7–9, 2012.

VASCONCELOS, N. M.; SILVA, M. L.; MAIA, J. G. S.; GOTTLIEB, O. R. Estudo químico das sementes do Cupuaçu. **Acta Amazonica**, v. 5, n. 3, p. 293-295, 1975.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*



CGPE: 15850

Transformação de tomate Micro-Tom
com um gene tipo-*PR* de cupuaçuzeiro
(*Theobroma grandiflorum*) visando ao
estudo de função da proteína



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
343**

**Transformação de tomate Micro-Tom
com um gene tipo-PR de cupuaçuzeiro
(*Theobroma grandiflorum*) visando ao
estudo de função da proteína**

*Joseilde Oliveira Silva-Werneck
Leila Maria Gomes Barros
Michelly da Silva Neves
Loeni Lüdke Falcão
Lucilia Helena Marcellino*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4700
Fax: +55 (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Marília Lobo Burle

Secretária-Executiva
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Membros
Antonieta Nassif Salomão; Diva Maria Alencar Dusi; Francisco Guilherme V. Schmidt; João Batista Teixeira; João Batista Tavares da Silva; Maria Cléria Valadares Inglis; Rosameres Rocha Galvão; Tânia da Silveira Agostini Costa

Supervisão editorial
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Revisão de texto
João Batista Teixeira

Normalização bibliográfica
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Tratamento das ilustrações
Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Adilson Werneck

Foto da capa
Joseilde O. Silva-Werneck e acervo Embrapa

1ª edição

1ª impressão (ano): tiragem

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Transformação de tomate Micro-Tom com um gene tipo-*PR* de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) visando ao estudo de função da proteína / Joseilde Oliveira Silva-Werneck... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2018.

16 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 343).

ISSN: 0102-0110

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader

Modo de Acesso: World Wide Web

1. Transgênico. 2. Tomateiro. 3. Cupuaçu. I. Silva-Werneck, Joseilde Oliveira. II. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. III. Série

Ana Flávia do N. Dias Côrtes (CRB-1999)

631.52 – CDD 21

© Embrapa, 2018

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	12
Conclusão.....	16
Agradecimentos.....	16
Referências	17

Transformação de tomate Micro-Tom com um gene tipo-PR de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) visando ao estudo de função da proteína

Joseilde Oliveira Silva-Werneck¹

Leila Maria Gomes Barros²

Michelly da Silva Neves³

Loeni Lüdke Falcão⁴

Lucilia Helena Marcellino⁵

Resumo – O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) é uma espécie frutífera amazônica, cuja produção é altamente afetada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da doença vassoura-de-bruxa (VB). Diversos genes potencialmente envolvidos com a resposta ao patógeno foram identificados em cupuaçuzeiro, entre eles, alguns que codificam para proteínas do tipo PR (pathogenesis related). Neste trabalho, o gene *TgPRA* foi selecionado para estudos funcionais por expressão heteróloga em tomate Micro-Tom-*Rg1* (MT-*Rg1*). Esta planta possui interação compatível com *M. perniciosa* (biótipo-S), sendo um bom modelo para estudos sobre VB. O gene *TgPRA* foi clonado no vetor pBI121, sob o controle do promotor de *ACT2* de *Arabidopsis*. O vetor resultante, pBI121-TgPRA, contendo também o gene repórter *gus* e o de seleção *nptII*, foi inserido em *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, a qual foi usada na transformação de MT-*Rg1*. Foram obtidas plantas T0 resistentes à canamicina e que também expressaram o gene *gus*, potencialmente transformadas com o gene de interesse, o que será confirmado por análises de PCR e *Southern blot*. As plantas estão sendo cultivadas para obtenção de MT-*Rg1* em homozigose para *TgPRA*. Estas plantas serão, futuramente, submetidas a bioensaios com *M. perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos, visando avaliar a função de *TgPRA* no desenvolvimento de VB, assim como de outras doenças, incluindo algumas de interesse para a tomaticultura.

¹ Agrônoma, Ph.D., pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Bióloga, Ph.D., pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Graduanda em Biologia, estagiária da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Agrônoma, M.Sc., analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵ Bióloga, Ph.D., pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Termos para indexação: tomate Micro-Tom, *Theobroma grandiflorum*, *Moniliophthora perniciosa*, *Agrobacterium tumefaciens*, transformação, gene *PR*

Transformation of tomato Micro-Tom with a cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) *PR*-like gene aiming the protein functional study

Abstract – The cupuassu tree (*Theobroma grandiflorum*) is an Amazonian fruit species, whose production is highly affected by the fungus *Moniliophthora perniciosa*, which causes the witches' broom (WB) disease. Several genes potentially involved in the response to the pathogen have been identified in cupuassu, including some that code for PR (pathogenesis related)-like proteins. In this work, the gene *TgPRa* was selected for functional studies by heterologous expression in tomato Micro-Tom-*Rg1* (MT-*Rg1*). This plant presents compatible interaction with *M. perniciosa* (biotype S), being a good model for WB studies. The *TgPRa* gene was cloned into pBI121, under the control of the Arabidopsis *ACT2* promoter. The resulting vector, pBI121-*TgPRa*, also containing the *gus* reporter gene and the *nptII* selection gene, was inserted into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, which was used in the MT-*Rg1* transformation. Kanamycin resistant and GUS-positive T0 plants, potentially transformed with the gene of interest, were obtained, what will be confirmed by PCR and *Southern blot* analysis. Plants are being grown to obtain MT-*Rg1* homozygous for *TgPRa*. These plants will, in near future, be submitted to bioassays with *M. perniciosa* and other phytopathogenic fungi, aiming to evaluate the role of *TgPRa* in the development of WB, as well as other diseases, including some of interest to tomato cultivation.

Index terms: tomato Micro-Tom, *Theobroma grandiflorum*, *Moniliophthora perniciosa*, *Agrobacterium tumefaciens*, transformation, *PR* gene

Introdução

O cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schumm., é uma fruteira nativa da Amazônia com enorme potencial econômico devido às múltiplas utilidades de sua polpa e amêndoas (sementes). Vários produtos são obtidos a partir do cupuaçu, como sucos, sorvetes, licores, compotas, geleias, doces, cosméticos e cupulate, produto similar ao chocolate (Calzavara et al., 1984; Nazaré et al., 1990; Alves et al., 2014). Além disso, o cupuaçuzeiro apresenta a vantagem de poder ser cultivado em sistema agroflorestal, tornando-se uma forma de cultivo sustentável e assumindo grande importância socioeconômica e ambiental para a região (Alves et al., 2014). A cultura do cupuaçu, assim como a do cacau, é afetada pela doença vassoura-de-bruxa (VB), causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, responsável por grande redução na produção de frutos.

Para dar suporte ao programa de melhoramento desta cultura, iniciou-se a caracterização dos genes expressos em cupuaçuzeiro por RNAseq. Recentemente, foi relatada por nosso grupo, a obtenção de cerca de 8.330 ESTs (*expressed sequence tags*) de polpa e semente de cupuaçuzeiro, a partir das quais foi possível identificar diversos EST-SSRs (*EST-simple sequence repeats*) (Santos et al., 2016), assim como diversos genes com potencial envolvimento na resposta a patógenos. Dentre estes genes, foram identificados alguns codificadores de proteínas relacionadas à patogênese, proteínas PR. Estas proteínas se expressam nas plantas em resposta ao ataque de um patógeno (Van Loon, 1997), e formam um grupo diverso de proteínas que são atualmente classificadas em 17 famílias (Tabela 1), com base na sequência de aminoácidos, função biológica e reação sorológica (Van Loon; Van Strien, 1999; Van Loon et al., 2006; Gorjanović, 2009; Cao et al., 2016).

Tabela 1. Famílias de proteínas de plantas relacionadas à patogênese (PR).

Família	Propriedades	Família	Propriedades
PR-1	Desconhecida	PR-10	Similar a ribonuclease
PR-2	β -1,3-glucanase	PR-11	Quitinase tipo I
PR-3	Quitinase tipo I, II, IV, V, VI, VII	PR-12	Defensina
PR-4	Quitinase tipo I, II	PR-13	Tionina
PR-5	Similar a Taumatina	PR-14	Proteína transportadora de lipídeos
PR-6	Inibidor de proteinase	PR-15	Oxalato oxidase
PR-7	Endoproteinase	PR-16	Proteína similar à oxalato oxidase
PR-8	Quitinase tipo III	PR-17	Desconhecida
PR-9	Peroxidase		

Fonte: Van Loon et al, 2006.

Além da resposta ao patógeno, as PRs podem ser sintetizadas em situações de estresses abióticos, ferimentos e moléculas sinalizadoras como ácido salicílico (AS), etileno e jasmonato (Van Loon et al., 2006; Anil Kumar et al., 2015).

Em nossas análises do transcriptoma de cupuaçuzeiros desafiados por *M. pernicioso*, foram identificados alguns genes tipo-PR, cuja expressão foi alterada na presença do patógeno (Silva, 2015). Para um estudo mais detalhado, selecionamos um dos genes, aqui denominado *TgPRA*, para análise funcional por expressão heteróloga em tomate (*Solanum lycopersicum*) variedade Micro-Tom-*Rg1* (MT-*Rg1*). A escolha desta planta se deve ao fato de MT apresentar interação compatível com *M. pernicioso* (biótipo-S) e desenvolver sintomas similares aos da VB em cacau (Marelli et al., 2009). Além disso, por ter um ciclo de vida curto e ser de relativa facilidade de transformação, MT se torna um bom modelo de estudo de genes envolvidos na resposta a *M. pernicioso*. Recentemente, este sistema foi utilizado para a avaliação de gene *tcBax1* de cacau, codificadora de uma proteína atenuadora de morte celular programada, tendo sido demonstrada a diminuição de sintomas de VB em tomate transgênico (Scotton et al., 2016). Aqui, reportamos a obtenção de tomate MT-*Rg1* transformado com *TgPRA* para futuros estudos funcionais desta proteína *in planta*.

Material e Métodos

Material vegetal

Sementes de tomate MT-Rg1 (Pino et al., 2010) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Lázaro E. P. Peres, provenientes da coleção de mutantes de tomateiro Micro-Tom do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ - USP (São Paulo, Brasil). Para multiplicação das sementes, as mesmas foram plantadas em vasos, contendo mistura de latossolo vermelho, areia lavada, adubo orgânico de gado, na proporção de 3:1:1, complementado com calcário e adubo químico NPK (3-17-0). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, até a produção dos frutos. As sementes foram extraídas de tomates maduros, secadas no laboratório sobre papel pardo e armazenadas na geladeira (4°C).

Construção do vetor pBI121-TgPRa

O vetor binário pBI121-TgPRa foi construído utilizando como base o vetor pBI121 (Chen et al., 2003). Inicialmente, foi sintetizado o cassete de expressão do gene *TgPRa*, consistindo de promotor de *ACT2* (promotor de *actina* de *Arabidopsis thaliana*), região codificante do gene *TgPRa* e o terminador *nos* (nopalina sintase). Este cassete, de 2,3 kb, foi então clonado no sítio de restrição de HindIII de pBI121, resultando no vetor pBI121-TgPRa, contendo também o gene repórter *gus* (β -glucoronidase) e o gene *nptII* (neomicina fosfotransferase) para seleção de plantas transformadas. Além destes, o plasmídeo contém o gene *kanR* para a seleção de clones de *A. tumefaciens* transformados. O vetor foi construído por Epoch Life Science Inc (Texas, USA).

Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com pBI121-TgPRa

O plasmídeo pBI121-TgPRa foi introduzido em *A. tumefaciens* GV3101 via eletroporação, conforme Lacorte e Romano (Lacorte; Romano, 2015). Foram utilizados 10 ng do vetor, 50 μ L de células competentes e ele-

troporação a 2,2 kV, 200 Ω , 25 μ F, em eletroporador Micropulse (BioRad). Em seguida, as células foram cultivadas em meio LB (triptona 10 g.L⁻¹, NaCl 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹, pH 7,0) por 2 h, a 28°C, 180 rpm. A seleção das bactérias transformadas foi realizada em LB-ágar contendo canamicina (100 mg.L⁻¹), rifampicina (50 mg.L⁻¹) e gentamicina (50 mg.L⁻¹) e incubação a 28°C, por 48-72 h.

PCR para detecção do gene *gus* em *A. tumefaciens*

Transferiu-se uma colônia isolada de *A. tumefaciens* transformada com pBI121-TgPRa para um tubo de PCR contendo 25 μ L de água MilliQ. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 50 μ L nas seguintes condições: tampão de PCR 1 X (Ludwig Biotec), MgCl₂ 2,0 mM (Ludwig Biotec), dNTP mix 0,2 mM (Invitrogen), primer gusF1 (5'-CTATCAGCTCTTTAATCGCCTGTAAG-3') 0,4 μ M, primer gusR1 (5'-GTGAAGGTTATCTCTATGAACTGTGC-3') 0,4 μ M e Taq DNA Polimerase (Ludwig Biotec) 2,5 U. Como controles negativos, utilizou-se água MilliQ e uma colônia de *A. tumefaciens* GV3101 não transformada. Como controles positivos, utilizou-se DNA purificado do vetor pBI121 (10 ng) e uma colônia do clone de pBI121. As reações foram realizadas em termociclador (BioRad MJ Mini), utilizando-se o seguinte programa: 94°C/4 min, 30 ciclos a 94°C/40 seg, 52°C/40 seg, 72°C/40 seg, e extensão final a 72°C/5 min. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X (Trizma-base 45 mM, Ácido bórico 45 mM, EDTA 1,0 mM) corado com brometo de etídio (0,5 mg.L⁻¹).

Transformação e regeneração de tomate MT-Rg1

A metodologia de transformação de MT-Rg1 foi adaptada de diversos trabalhos (Dan et al., 2006; Sun et al., 2006; Abu-el-Heba; Hussein, 2008; Pino et al., 2010).

Cerca de 150 sementes de tomate MT-Rg1 foram hidratadas por 1 h em água destilada, à temperatura ambiente (TA). Em seguida, foram descontaminadas substituindo-se a água por etanol 70% e incubação por 5 min à TA. Retirou-se o etanol, adicionou-se hipoclorito de sódio à concentração de 2,0%-2,5% de cloro ativo, contendo Tween-20 a 0,05% e o material foi incu-

bado à TA por 40 min, agitando-se frequentemente. Em capela de fluxo laminar, o hipoclorito foi retirado e as sementes lavadas 4 vezes com água MilliQ estéril. Após a última lavagem, as sementes foram vertidas sobre papel-filtro estéril e transferidas para placas de Petri (30 sementes por placa) contendo meio de germinação, composto por 0,5 x sais de MS, 0,5 x vitaminas B5, sacarose 15 g.L⁻¹, ágar 7 g.L⁻¹, pH 5,6 (Murashige; Skoog, 1962; Gamborg et al., 1968). Incubou-se em sala de cultivo in vitro, a 26°C, por 6 dias no escuro, seguido por dois dias com fotoperíodo de 16 h. As demais incubações foram realizadas nas seguintes condições: temperatura de 26°C ± 2, fotoperíodo de 16 h (lâmpadas frias, brancas e fluorescentes) e luminosidade de aproximadamente 5.500 lx. Dois dias antes da transformação, o clone de *A. tumefaciens* transformado com o vetor pBI121-TgPRA foi inoculado em 2 mL de meio LB contendo rifampicina 50 mg.L⁻¹, gentamicina 50 mg.L⁻¹ e canamicina 100 mg.L⁻¹, e incubado a 28°C, 180 rpm, por 24 h. Em seguida, foram espalhados 150 µL da cultura sobre LB-ágar, contendo os mesmos antibióticos seletivos, e incubou-se a 28°C, por 24 h. Ressuspendeu-se a agrobactéria em meio de cocultura líquido (sais de MS, vitaminas B5, sacarose 30 g.L⁻¹, pH 5,6, acetoseringona 40 mg.L⁻¹), ajustou-se a OD (A600) para aproximadamente 0,4 e distribuiu-se a suspensão em placas de Petri. Segmentos de cotilédones (explantos) de plântulas com 8 dias de idade foram incubados na suspensão de *A. tumefaciens* transformada, ou em meio de cocultura (controle), por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, os explantes foram secos em papel-filtro estéril e transferidos para meio de cocultura sólido (sais de MS, vitaminas B5, sacarose 30 g.L⁻¹, ágar 7,0 g.L⁻¹, pH 5,6, acetoseringona 40 mg.L⁻¹, zeatina 1,0 mg.L⁻¹, BAP 1,0 mg.L⁻¹), em placas de Petri, com o lado abaxial para baixo. Os explantes foram incubados em sala de cultivo in vitro, no escuro, por dois dias. Após este período, os explantes foram transferidos para placas de Petri contendo meio de regeneração (sais de MS, vitaminas B5, sacarose 30 g.L⁻¹, ágar 7,0 g.L⁻¹, pH 5,6, zeatina 1,0 mg.L⁻¹, BAP 1,0 mg.L⁻¹), contendo carbenicilina 500 mg.L⁻¹, timentin 300 mg.L⁻¹ e canamicina 50 mg.L⁻¹. Para os explantes controles, não foi adicionada canamicina ao meio. Os explantes foram cultivados em sala de cultivo in vitro, por aproximadamente 3 semanas, com uma transferência para o mesmo meio depois de aproximadamente 15 dias. Após a regeneração, os brotos foram transferidos para meio de alongamento (sais de MS, vitaminas B5, sacarose 30 g.L⁻¹, ágar 7,0 g.L⁻¹, pH 5,6, zeatina 0,5 mg.L⁻¹), contendo carbenicilina 500 mg.L⁻¹,

timentin 300 mg.L⁻¹ e canamicina 50 mg.L⁻¹, em placas de Petri, e cultivados em sala de cultivo in vitro, por aproximadamente 3 semanas. Os brotos regenerados foram transferidos para frascos de vidro contendo meio de enraizamento (saís de MS, vitaminas B5, sacarose 30 g.L⁻¹, ágar 7 g.L⁻¹, pH 5,6, AIB 1,0 mg.L⁻¹), adicionado de carbenicilina 500 mg.L⁻¹, timentin 300 mg.L⁻¹ e canamicina 50 mg.L⁻¹, e mantidos em sala de cultivo in vitro até enraizamento suficiente para aclimação em solo.

Ensaio histoquímico de GUS para detecção de plantas positivas

O teste histoquímico de GUS (β -glucuronidase) foi realizado de acordo com Lacorte e Barros (Lacorte; Barros, 2015). Fragmentos de folhas ou raízes foram incubados em microtubos de 1,5 mL contendo tampão de reação [tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0, ferricianeto de potássio 2,0 mM, Na₂EDTA.2H₂O 10 mM, Triton X-100 0,1%, X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucoronídeo) 1,0 mM], em volume suficiente para cobrir a amostra, no escuro, a 37°C, por 16 a 18 h. Em seguida, retirou-se o tampão de reação e adicionou-se etanol 70%. Após 24 a 48 horas, fazendo algumas trocas do etanol, as amostras foram observadas a olho nu ou sob lupa.

Resultados e Discussão

Um gene tipo-*PR* identificado no transcriptoma do cupuaçuzeiro, denominado *TgPRA*, foi selecionado para avaliação funcional em tomate MT-*Rg1*. Inicialmente, este gene foi clonado no vetor pBI121 (14.758 pb), sob o controle do promotor de *ACT2* e terminador *nos*. O plasmídeo resultante, pBI121-TgPRA, está representado na figura 1.

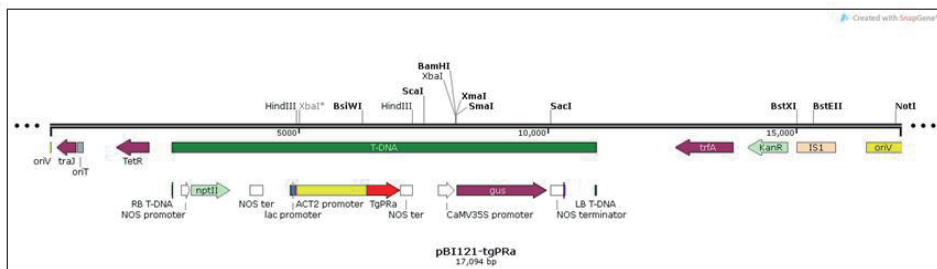


Figura 1. Representação esquemática linear do plasmídeo pBI121-TgPRA. O T-DNA possui 8,5 Kb e compreende o segmento entre a borda direita (RB) e a borda esquerda (LB), contendo o gene de interesse *TgPRA* sob o controle do promotor de *ACT2*, o gene repórter *gus* e o gene *nptII* que confere resistência à canamicina.

Nesta construção, o gene *TgPRA* está sob o controle do promotor do gene *actina 2* (*ACT2*) de *Arabidopsis*, que regula a expressão constitutiva em tecidos vegetativos. Em estudos de atividade regulatória, usando o sistema do gene repórter *gus*, o promotor de *ACT2* mostrou-se mais forte que o promotor CaMV35S em plantas de *Arabidopsis* (An et al., 1996; An; Meagher, 2010). Assim, é provável que a planta transformada com este vetor expresse a proteína TgPRA constitutivamente e em níveis significativos.

Para transformação de tomate MT-*Rg1*, inicialmente foi realizada a inserção do vetor pBI121-TgPRA em *A. tumefaciens* GV3101. Clones resistentes à canamicina foram selecionados e analisados quanto à presença do vetor por PCR, utilizando primers para o gene *gus*. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose. A figura 2 mostra a presença do amplicon de 450 pb (seta) do clone PRA-2, correspondente à amplificação de um fragmento do gene *gus*, confirmando a transformação da agrobactéria.

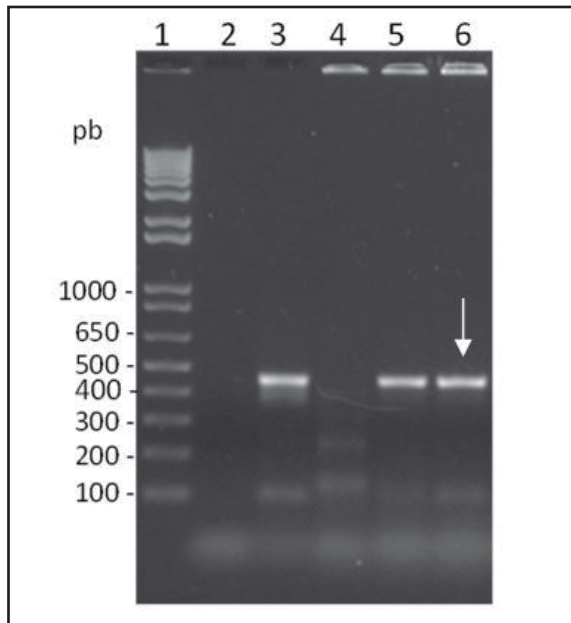


Figura 2. Análise por PCR de *Agrobacterium tumefaciens* transformada com pBI121-TgPRA. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR. 1 – 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); controles negativos: 2 – água; 4 – *A. tumefaciens* GV3101 não transformada; controles positivos: 3 – vetor pBI121; 5 – *A. tumefaciens* GV3101 transformada com pBI121; 6 – clone PRA-2.

Para a transformação de tomateiro MT-Rg1, tecido cotiledonar foi cocultivado com *A. tumefaciens* carregando o vetor pBI121-TgPRA. O cultivo subsequente do tecido vegetal em meio de regeneração, acrescido de canamicina, permitiu obter diversos brotos resistentes ao antibiótico e, portanto, potencialmente transgênicos. Para confirmação da inserção do T-DNA, procedeu-se ao teste histoquímico de GUS. Foram testados fragmentos foliares dos brotos de MT-Rg1 no momento da transferência para meio de enraizamento, assim como fragmentos foliares e de raízes no momento da aclimação das plantas em casa de vegetação. Inicialmente, seis brotos foram testados e todos apresentaram reação positiva, evidenciada pela coloração azul (Figura 3).

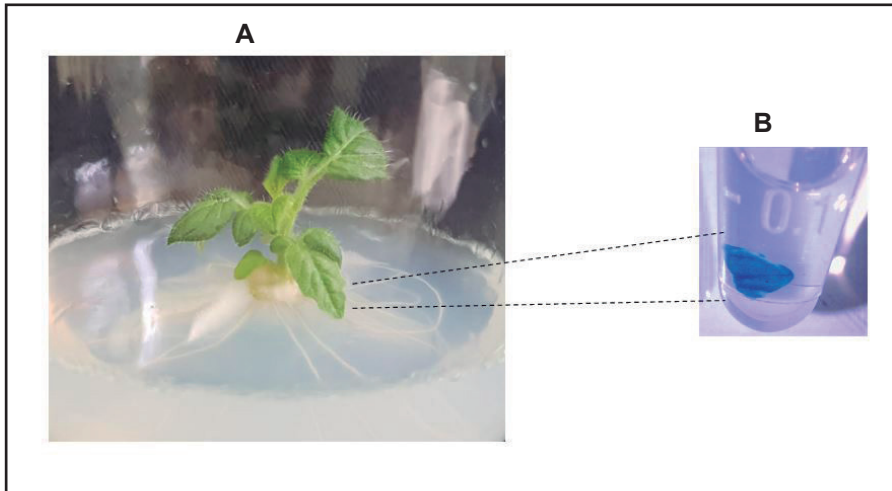


Figura 3. Transformação genética de tomateiro *Micro-Tom-Rg1*. A) Tomateiro *MT-Rg1* transformado com *pBI121-TgPRa* cultivado em meio de enraizamento contendo canamicina. B) Fragmento foliar apresentando coloração azul após ensaio histoquímico de GUS.

Este resultado indica a presença do gene repórter *gus* e, provavelmente, do gene de interesse *TgPRa*, já que ambos se encontram no T-DNA. Estas plantas T0 estão sendo cultivadas em casa de vegetação para análises moleculares por PCR e *Southern blot*, a fim de determinar a presença e o número de cópias do transgene, e para obtenção de plantas em homozigose para *TgPRa*. Estas plantas serão, futuramente, testadas por meio de bioensaios com *M. perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos, visando avaliar a função da proteína TgPRa no desenvolvimento de VB e de outras doenças, incluindo algumas de interesse para a tomaticultura.

A expressão heteróloga de proteínas PR em plantas é uma ferramenta que tem sido usada para estudos de função, assim como para obtenção de plantas com características desejáveis. Por exemplo, foi verificado que a superexpressão de uma PR-1 de pimenteira em fumo aumenta a resistência a estresses bióticos (fungos e bactérias) e tolerância parcial a metais pesados (cádmio e mercúrio) (Sarowar et al., 2005). As osmotinas e proteínas tipo-osmotina (Osmotin-like proteins - OLPs), membros da família PR-5, têm sido expressas em diversas espécies de plantas, como batata, fumo, tomate, soja,

Arabidopsis, etc, sendo observados efeitos como aumento de resistência ou tolerância a fungos, a estresses osmóticos, a frio e a seca (Anil Kumar et al., 2015). Mais recentemente, foi relatada que a expressão heteróloga de uma PR-4 em videira aumenta a resistência a oídio (Ali et al., 2018). Desta forma, a obtenção de tomate transformado com *TgPRa* é uma etapa importante para o estudo de função desta proteína de cupuaçu.

Conclusões

Plantas de tomateiro MT-*Rg1* geneticamente modificadas, contendo o gene *TgPRa*, foram obtidas. A disponibilidade destas plantas permitirá uma avaliação do papel da proteína TgPRa no desenvolvimento da doença vassoura-de-bruxa. Adicionalmente, será possível o estudo da ação desta proteína contra outros fitopatógenos de interesse, não só para a cultura de cupuaçu, mas também para a tomaticultura.

Agradecimentos

À Embrapa, CAPES e Fundação Agropolis (França), pelo cofinanciamento do projeto “Interação entre *Theobroma grandiflorum* e *Moniliophthora perniciosa*: Estudos de Associação e Genômica Funcional” (Embrapa nº 02.14.02.002.00.00). À Dra. Glaucia Barbosa Cabral, pelas discussões sobre protocolos de regeneração de plantas de tomate.

Referências

- ABU-EL-HEBA, G. A.; HUSSEIN, G. M.; ABDALLA, N. A. A rapid and efficient tomato regeneration and transformation system. **Agriculture and Forestry Research**, v. 1, n. 2, p. 103–110, 2008.
- ALI, S.; GANAI, B. A.; KAMILI, A. N.; BHAT, A. A.; MIR, Z. A.; BHAT, J. A.; TYAGI, A.; ISLAM, S. T.; MUSHTAQ, M.; YADAV, P.; RAWAT, S.; GROVER, A. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. **Microbiological Research**, v. 212–213, p. 29–37, 2018.
- ALVES, R. M.; FILGUEIRAS, G. C.; HOMMA, A. K. O. Aspectos sócio-econômicos do cupuaçuzeiro na amazônia: do extrativismo a domesticação. In: SANTANA, A. C. DE (Ed.). **Mercado, cadeia produtiva e desenvolvimento rural na Amazônia**. 1. ed. Belém, PA: UFRA, 2014. p. 197–223.
- AN, Y.-Q.; MCDOWELL, J. M.; HUANG, S.; MCKINNEY, E. C.; CHAMBLISS, S.; MEAGHER, R. B. Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. **Plant Journal**, v. 10, p. 107–121, 1996.
- AN, Y. Q. C.; MEAGHER, R. B. Strong Expression and Conserved Regulation of ACT2 in *Arabidopsis thaliana* and *Physcomitrella patens*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 28, n. 3, p. 481–490, 2010.
- ANIL KUMAR, S.; HIMAKUMARI, P.; SHRAVAN KUMAR, G.; MOHANALATHA, C.; KAVI KISHOR, P. B. Osmotin: a plant sentinel and a possible agonist of mammalian adiponectin. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. March, p. 1–16, 2015.
- CALZAVARA, B. B. G.; MÜLLER, C. H.; KAHWAGE, O. de N. da C. Fruticultura tropical: o cupuaçuzeiro: cultivo, beneficiamento e utilização do fruto. Belém, PA: EMBRAPA-CPATU, 1984. 101 p. il (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 32).
- CAO, J.; LV, Y.; HOU, Z.; LI, X.; DING, L. Expansion and evolution of thaumatin-like protein (TLP) gene family in six plants. **Plant Growth Regulation**, v. 79, n. 3, p. 299–307, 9 jul. 2016.
- CHEN, P.; WANG, C.; SOONG, S.; TO, K. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. **Molecular Breeding**, v. 11, n. 4, p. 287–293, 2003.
- DAN, Y.; YAN, H.; MUNYIKWA, T.; DONG, J.; ZHANG, Y.; ARMSTRONG, C. L. MicroTom—a high-throughput model transformation system for functional genomics. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 5, p. 432–441, 2006.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A. ; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

GORJANOVIĆ, S. A review: biological and technological functions of barley seed pathogenesis - related proteins (PRS). **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, n. 4, p. 334–360, 2009.

LACORTE, C.; BARROS, L. M. G. Genes repórteres *gus* (β -glucuronidase) e *gfp* (proteína verde-fluorescente). In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. 2.ed. Brasília: Embrapa, 2015. p. 147–164.

LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium* spp. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2015. p. 55–71.

MARELLI, J. P.; MAXIMOVA, S. N.; GRAMACHO, K. P.; KANG, S.; GUILTINAN, M. J. Infection biology of *Moniliophthora perniciosa* on *Theobroma cacao* and alternate solanaceous hosts. **Tropical Plant Biology**, v. 2, n. 3, p. 149–160, 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, 1 jul. 1962.

NAZARÉ, R. F. R. de; BARBOSA, W. C.; VIEGAS, R. M. F. **Processamento das sementes de cupuaçu para a obtenção de cupulate**. Belém, PA: Embrapa-CPATU, 1990. 37 p. il. (Embrapa-CPATU. Boletim de pesquisa, 108).

PINO, L. E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M. S.; SCOTTON, D. C.; BORGIO, L.; QUECINI, V.; FIGUEIRA, A.; PERES, L. E. The *Rg1* allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato “Micro-Tom” model system. **Plant methods**, v. 6, p. 23, 2010.

SANTOS, L. F.; FREGAPANI, R. M.; FALCÃO, L. L.; TOGAWA, R. C.; COSTA, M. M. do C.; LOPES, U. V.; GRAMACHO, K. P.; ALVES, R. M.; MICHELI, F.; MARCELLINO, L. H. First microsatellite markers developed from cupuassu ESTs: application in diversity analysis and cross-species transferability to cacao. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–19, 2016.

SAROWAR, S.; YOUNG, J. K.; EUI, N. K.; KI, D. K.; BYUNG, K. H.; ISLAM, R.; JEONG, S. S. Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. **Plant Cell Reports**, v. 24, n. 4, p. 216–224, 2005.

SCOTTON, D. C.; AZEVEDO, M. D. S.; SESTARI, I.; DA SILVA, J. S.; SOUZA, L. A.; PERES, L. E. P.; LEAL, G. A.; FIGUEIRA, A. Expression of the *Theobroma cacao* Bax-inhibitor-1 gene in tomato reduces infection by the hemibiotrophic pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **Molecular Plant Pathology**, p. 1–12, 2016.

SILVA, R. J. S. **Caracterização in silico e análise de expressão de genes do tipo PR de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*)**. 2015. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

SUN, H. J.; UCHII, S.; WATANABE, S.; EZURA, H. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. **Plant and Cell Physiology**, v. 47, n. 3, p. 426–431, 2006.

VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, p. 753–765, 1997.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, n. 1, p. 135–162, 2006.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The Families of Pathogenesis-Related Proteins, Their Activities, and Comparative Analysis of PR-1 Type Proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, n. 2, p. 85–97, 1999.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*

CGPE: 14947

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

